

ÜBER B-LYMPHOZYTEN SPEZIFISCHE ANTIGENE
BEIM SCHWEIN

Karin Weber

1980

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. Dr. h.c. A. Mayr)
und dem Institut für
Blutgruppen- und Resistenzforschung der Tierzuchtforschung e.V.
München
(Wissenschaftlicher Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. Dr. h.c. A. Mayr)
Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. D.O. Schmid

ÜBER B- LYMPHOZYTEN SPEZIFISCHE ANTIGENE
BEIM SCHWEIN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Karin Weber
aus
Augsburg

München 1980

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen
Fakultät der Universität München

Dekan: Prof. Dr. J. v. Sandersleben

Referent: Prof. Dr. D. O. Schmid

Korreferent: Prof. Dr. U. Lösch

Tag der Promotion: 25. Juli 1980



MEINEN ELTERN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551902_0041

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	
2.1. Charakterisierung der B- und T- Lymphozyten	4
2.2. Isolierung von B- und T- Lymphozyten	9
2.3. B- Lymphozyten spezifische Antigene und ihr Nachweis	14
2.4. Der Histokompatibilitätskomplex beim Schwein	16
3. Eigene Untersuchungen	
3.1. Versuchstiere	19
3.2. Gewinnung von Antilymphozytenseren	21
3.3. Lymphozytenisolierung	25
3.3.1. Methoden zur Gewinnung von B- und T- Lymphozyten beim Schwein	
3.3.1.1. Trennung durch Rosettierung mit Schaferythrozyten	27
3.3.1.2. Trennung in der Nylonwollensäule	30
3.3.1.3. Trennung in antikörperbeschichteten Petrischalen	32
3.4. Serologischer Nachweis von B- Lymphozyten spezifischen Antigenen	37

4.	Ergebnisse	
4.1.	B- und T- Lymphozyten und ihre Fraktionierung	
4.1.1.	Trennung durch Spontanrosettierung	42
4.1.2.	Trennung in der Nylonwollensäule	43
4.1.3.	Trennung in antikörperbeschichteten Petrischalen	45
4.2.	Serologischer Nachweis von B- Lymphozyten spezifischen Antigenen beim Schwein	50
4.3.	Vererbung von B- Lymphozyten spezifischen Antigenen beim Schwein	58
5.	Diskussion	
5.1.	Besprechung der Methodik	59
5.2.	Besprechung der immungenetischen Ergebnisse	66
6.	Zusammenfassung	74
7.	Summary	76
8.	Literaturverzeichnis	78

1. Einleitung

Grundlegend für die Entdeckung der Histokompatibilität bei Mensch und Tier war die Beobachtung von GORER (1938), daß nach Abstoßung von Hauttransplantaten Antikörper gebildet werden, die mit den Leukozyten der Hautspender reagieren. MEDAWAR (1946) induzierte durch intradermale Injektion von Leukozyten eine spezifische Immunität gegen Transplantationsantigene mit einer beschleunigten Abstoßung der Hauttransplantate. Die Überlebensdauer von Hauttransplantaten ist von der Anzahl der zwischen Spender und Empfänger inkompatiblen Antigene abhängig (CEPPELLINI et al., 1967).

Mit dem Lymphozytenantigen MAC durch DAUSSET (1958) war das Histokompatibilitätssystem (HLA- System) des Menschen entdeckt.

Heute wird das HLA- System als Teil des genetisch determinierten Histokompatibilitätskomplexes des Menschen mit multiplen Allelen an fünf Loci beschrieben (ALBERT et al., 1978).

Histokompatibilitätsloci, die für das Überleben eines Individuums von entscheidender Bedeutung sind, wurden nicht nur beim Menschen, sondern auch bei allen bisher untersuchten Wirbeltieren nachgewiesen.

Die Funktion des Histokompatibilitätssystems reicht von der Möglichkeit einer Erkennung körperfremder beziehungsweise transformierter Zellen (ZINKERNAGEL und DOHERTY, 1977) bis zur Regulation einer Immunabwehr (THORSEBY, 1978).

In der D- Region des HLA- Systems des Menschen kodieren Ir- Gene (Immune response) die DR- (D- Related) oder Ia- Antigene (Immune Response Region Asociated Antigens) (COLOMBANI, 1978; DAVID, 1979). Die Ir- Gene steuern die Immunitätsbildung (ALBERT et al., 1977). Ia- Antigene sind auf B- Lymphozyten mit spezifischen Immunseren serologisch markierbar (VAN ROOD, 1975; ALBRECHTSEN et al., 1978).

Das Histokompatibilitätssystem des Schweines, das SLA- System, ist mit dem HLA- System des Menschen, sowie mit dem H 2- System der Maus vergleichbar. VAIMAN (1979) wies auf die große Bedeutung des SLA- Systems bei der Gewebsverträglichkeit und der Immunantwort hin.

Es kann davon ausgegangen werden, daß die B- Lymphozyten spezifischen Antigene beim Schwein (VAIMAN et al., 1975) den Ia- Antigenen des Menschen (ALBERT, 1973) homolog und auch markierbar sind.

Ia- Antigene wurden auch beim Rind (USINGER et al., 1972; CICHON, 1979), bei der Maus (HÄMMERLING, 1976), beim Meerschweinchen (SHEVACH und SCHWARTZ, 1977), beim Kaninchen (CRESSWELL und GEIER, 1975), beim Hund (GOLDMANN et al., 1975) und beim Rhesusaffen (BALNER et al., 1976) nachgewiesen.

Beim Menschen wurden Beziehungen zwischen HLA- Antigenen und bestimmten immunologisch bedingten Erkrankungen gefunden (BERTRAMS, 1976; VAN ROOD, 1977).

Die Histokompatibilitätsantigene, die sich mit einer Krankheitsdisposition assoziiert erwiesen haben, konnten in erster Linie der HLA- D- Region, jedoch auch den Regionen HLA- A- B- und C zugeordnet werden.

Auch bei Nachweis dieser krankheitsassoziierten Antigene bleibt das Auftreten, die Ausprägung und die Form der Krankheit von endogenen und exogenen Faktoren abhängig (ALBERT, 1979).

Es liegt die Vermutung nahe, daß auch beim Schwein bestimmte Krankheitsdispositionen immungenetisch markierbar sind.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, einen Beitrag zur Markierung von B- Lymphozyten spezifischen Antigenen beim Schwein zu leisten.

2. Literaturübersicht

2.1. Charakterisierung der B- und T- Lymphozyten

Beim Menschen und allen untersuchten Tierarten lassen sich die B- und T- Lymphozyten morphologisch selbst unter dem Rasterelektronenmikroskop nicht sicher unterscheiden (NEWELL et al., 1976).

Durch ihre unterschiedliche Oberflächenladung können B- und T- Zellpopulationen elektrophoretisch aufgetrennt werden (ZEILLER und PASCHER, 1973; VASSAR et al., 1976).

Die B- und T- Lymphozyten unterscheiden sich in ihrer Funktion. Die B- Zellen sind für die humorale Immunantwort, die T- Zellen für die zellulären Immunreaktionen verantwortlich (MITSCHERLICH, 1977). Mittels geeigneter Membranmarker lassen sich die Lymphozytenpopulationen ebenfalls unterscheiden (Tabelle 1).

Funktionsfähige B- Lymphozyten besitzen an ihrer Membran Immunglobuline, die mit der Immunfluoreszenzmethode nachgewiesen werden können. Isolierte Lymphozyten werden mit einem fluorchromierten Antiserum inkubiert. Dabei binden sich die fluorchromierten Antikörper an die Membran- Immunglobuline der B- Lymphozyten und können fluoreszenzmikrosko-

Tabelle 1

Marker für B- und T- Lymphozyten

B- Lymphozyten- Marker:

Membran- Immunglobuline

EAC- Rosetten

Fc- Rezeptor

Epstein-Barr- Virus- Rezeptor

B- Lymphozyten spezifische Antiseren

Ulex- europeus- Lectin

Adhärenz zu Polyacrylsäurekügelchen

T- Lymphozyten- Marker:

Schäfererythrozyten- Rezeptor

Adhärenz an Masernvirus- infizierte Zellen

T- Lymphozyten spezifische Antiseren

Helix- pomatia- Lectin

α -Naphthylacetat-Esterase

pisch dargestellt werden (MUSCOPLAT et al., 1974; TAKASHIMA et al., 1977).

Die Komplementrezeptoren auf der B- Lymphozytenmembran können mit der EAC- Rosettierung (= Erytho-
cyte- Antibody- Complement- Rosettes) bestimmt werden. Schafererythrozyten, die mit Antikörpern und Komplement beladen sind, bilden mit den B- Lymphozyten EAC- Rosetten (SEILER et al., 1972).

Der Fc- Rezeptor der B- Zellen ist für die Anlagerung von Antigen- Antikörper- Komplexen verantwortlich und kann auch mit Markern besetzt werden (HALLBERG, 1975).

Die Nicht- T- nicht- B- Zellen besitzen ebenfalls einen Fc- rezeptorähnlichen Mechanismus auf der Zellmembran, jedoch bei gleichzeitigem Fehlen von Immunglobulinen (FROLAND und NATVIG, 1973; GREENBERG et al., 1973).

JONDAL und KLEIN (1973) entdeckten an den B- Lymphozyten einen spezifischen Rezeptor für das Epstein- Barr- Virus.

Die B- Lymphozyten spezifischen Antigene an der B- Zellmembran können mit geeigneten Seren nachgewiesen werden (ALBERT et al., 1977; JOHNSON et al.,

1977; VAN ROOD et al., 1977; ALBRECHTSEN et al., 1978).

GÜRTLER und CLEVE (1978) markierten B- Lymphozyten durch Koppelung an das Lectin aus *Ulex europaeus*. Ebenso konnten B- Zellen durch Anlagerung von Polyacrylsäurekügelchen charakterisiert werden (JONDAL, 1974; JÄGER et al., 1977).

T- Lymphozyten tragen in der Zellmembran Erythrozyten- Rezeptoren, die dazu befähigt sind, daß T- Lymphozyten des Menschen mit den Erythrozyten von Schaf, Ziege, Hund, Schwein und auch Pferd Spontanrosetten bilden (JOHANSEN et al., 1974).

Die Spontanrosettierung von T- Lymphozyten mit Erythrozyten ist innerhalb verschiedener Spezies unterschiedlich. So rosettieren Schweinelymphozyten sehr gut mit Schaferythrozyten (ESCAJADILLO und BINNS, 1975; SHIMIZU et al., 1975), als auch mit Erythrozyten von Ziegen und in geringerem Ausmaß mit Erythrozyten des Hundes (JOHANSEN et al., 1974). Pferdelymphozyten können mit Erythrozyten von Mensch und Meerschweinchen Spontanrosetten bilden (TARR et al., 1977; VAUTHEROT et al., 1977).

Spezifische T- Lymphozytenantigene, die in der Membran verankert sind, können auch mit Antiseren identifiziert werden (ALBERT et al., 1977).

VALDIMARSSON et al. (1975) wies die Adhärenz von T- Lymphozyten zu Masernvirus- infizierten Zellen nach. Die Affinität des Hämagglutinins aus *Helix pomatia* zu T- Lymphozyten stellten HAMMARSTRÖM et al. (1973) und UHLENBRUCK et al. (1973) als Marker für T- Lymphozyten fest.

MÜLLER et al. (1975) gelang es bei der Maus durch den Nachweis von α -Naphthylacetat-Esterase, T- Lymphozyten zu markieren. Durch Modifizierung dieser Methode gelang es auch bei den T- Lymphozyten des Menschen, die unspezifische Esterase als Marker einzusetzen (WITTING und HARJANS, 1980).

2.2. Isolierung von B- und T- Lymphozyten

BØYUM (1964) gelang die Isolierung von Lymphozyten mit dem Dichtegradienten Ficoll, einem hochmolekularen Polysaccharid in Kombination mit dem Röntgenkontrastmittel "Isopaque".

Bei der von OTTO und SCHMID (1970) und SCHOLLE et al. (1972) beschriebenen Trennmethode wurde als Dichtegradient das jodhaltige Röntgenkontrastmittel "Uromiro" (Dr. F. Köhler Chemie, Alsbach) eingesetzt. Mit dieser Methode ist es gelungen, reine Lymphozyten zu isolieren.

SEILER et al. (1972) testete die Spontanrosettierung von T- Lymphozyten des Menschen mit den Erythrozyten verschiedener Tierarten. Er kam zu dem Ergebnis, daß vorwiegend Erythrozyten von Schaf und Ziege, aber auch von Schwein und Pferd zur Rosettenbildung fähig sind.

Bei bovinen Lymphozyten führten nur Schafer erythrozyten zur Spontanrosettierung (FRUCHTMANN et al., 1977).

Meerschweinchenlymphozyten rosettieren nur mit Kaninchenlymphozyten (WILSON und COOMBS, 1973).

Schweinelymphozyten rosettieren mit Erythrozyten von Schaf, Ziege und auch Hund, jedoch nicht mit Erythrozyten von Pferd und anderen Schweinen (JOHANSEN et al., 1974).

Bei der Rosettierung von Schweinelymphozyten mit Schafererythrozyten fanden ESCAJADILLO und BINNS (1975) durchschnittlich 31,5 % Rosetten mit mehr als drei Erythrozyten pro Lymphozyt. MAYR und SCHLEGER (1978) kamen auf einen Prozentsatz von 31,1 % rosettierenden Zellen im Durchschnitt. Auch SHIMIZU et al. (1975) erhielten mit 36,9 % rosettierender Zellen bei der Spontanrosettierung von Schweinelymphozyten mit Schafererythrozyten ein ähnliches Ergebnis. REYERO et al. (1978) bekamen bei der Spontanrosettierung von Schweinelymphozyten mit Schafererythrozyten bei erwachsenen Tieren $38 \% \pm 8,4$ T- Zellen und $23,8 \% \pm 10,2$ B- Zellen. Die Anzahl der rosettierenden Zellen betrug bei Ferkeln in den ersten Lebenstagen 3 %. Der Anfangswert wuchs bis zum 10. Lebenstag schnell an und erreichte beim Absetzen der Ferkel um den 35. Lebenstag den Wert der erwachsenen Tiere. Da bei der Spontanrosettierung die mit Erythrozyten beladenen Lymphozyten bei der Dichtegradientenzentrifugation sedimentieren und die leicht-

ten B- Zellen sich zu einem Ring im Dichtegradienten ansammeln, ist diese Methode auch zur Isolierung von B- Lymphozyten geeignet.

Zur besseren Anlagerung der Schafererythrozyten an die T- Lymphozyten, können die Erythrozyten mit Neuraminidase vorbehandelt werden (GREWAL et al., 1976; ALBERT et al., 1977).

Die Methode der Nylonwollensäuletrennung stellt eine weitere Möglichkeit der Fraktionierung von B- und T- Lymphozyten dar.

EISEN et al. (1972), JULIUS et al. (1973), ROUSE und BABIUK (1974), GREAVES und BROWN (1974), VAIMAN et al. (1975) und WERNER et al. (1977) haben dieses Verfahren bei den Lymphozyten von Mensch, Nager, Rind und Schwein beschrieben.

Eine Nylonwollensäule wird mit einer Lymphozytensuspension gefüllt. Die B- Lymphozyten haften im Gegensatz zu den T- Lymphozyten an der Nylonwolle. Dieses Adhäsionsvermögen sichert eine ausreichende Trennung der T- Zellen von den B- Zellen. In einem weiteren Arbeitsgang lassen sich die B- Lymphozyten von der Nylonfaser ablösen.

Nach dieser Methode erhielten VAIMAN et al. (1975)

beim Schwein an nicht geschädigten, vitalen Lymphozyten 85 % der B- Zellen und 98 % der T- Zellen. Die Lymphozytenausbeute betrug nur 40 - 80 % der eingegebenen Zellen. WERNER et al. (1977) gewannen zwischen 44 - 64 % der ursprünglich eingefüllten humanen Lymphozyten zurück, die sich im Durchschnitt in 30 % B- Zellen und 60 % T- Zellen aufteilten.

Die B- Lymphozyten tragen an ihrer Zellmembran Immunglobuline (Ig), die zur Trennung von B- und T- Zellpopulationen genutzt werden können.

Die Methode besteht darin, daß auf mit Anti- Ig beschichteten Flächen die Ig tragenden B- Lymphozyten haften (MAGE et al., 1977).

WYSOCKI und SATO (1978) haben zur Trennung von B- und T- Lymphozyten der Maus Plastikpetrischalen mit im Kaninchen gewonnenen Anti- Immunglobulinen beschichtet.

Die B- Lymphozyten haften auf der mit reinem Kaninchen- Anti- Maus- Ig beschichteten Petrischale so stark, daß sie ohne Schädigung nicht von der Unterlage gelöst werden können. Die starke Bindung der Immunglobuline der B- Zellen an die Anti- Immunglobuline auf der Petrischale kann durch Verdünnen des reinen Anti- Ig mit natürlichem Kanin-

chen IgG vermindert werden. Der Zusatz von natürlichem Kaninchen IgG bewirkt, daß die Petrischale gleichmäßig mit weniger Anti- Ig beschichtet und somit eine geringere Anzahl von Oberflächenimmunglobulinen der B- Zellen gebunden wird. Dies erleichtert das Ablösen der an der Petrischale haftenden B- Lymphozyten.

Als beste Verdünnung von Anti- Ig : IgG hat sich das Verhältnis von 1 : 10 erwiesen.

Die so gewonnenen Zellpopulationen sind für eine serologische Untersuchung geeignet.

CATT und TREAGAR (1967) haben die beste Bindung von Antikörpermolekülen auf Polystyrenoberflächen im basischen Milieu beobachtet.

2.3. B- Lymphozyten spezifische Antigene und ihr

Nachweis

Die Histokompatibilitätsantigene werden in eine serologisch determinierbare Gruppe (SD = Serologically Defined) und eine durch die Funktion der Lymphozyten determinierbare Gruppe (LD = Lymphocyte Defined) unterteilt.

In der gemischten Lymphozytenkultur (MLC = Mixed Lymphocyte Culture, MLR = Mixed Lymphocyte Reaction), die BACH und HIRSCHHORN (1964), BAIN et al. (1964) und MEMPEL und GROSSE-WILDE (1973) beim Menschen beschrieben haben, wird anhand der Lymphozyten- Transformation die Gesamtheit der LD- Differenzen zwischen zwei genetisch unterschiedlichen Individuen erfaßt. Auf die starke Stimulation der B- Lymphozyten reagieren die T- Lymphozyten mit Blastenbildung (LOHRMANN et al., 1974). Die Lymphozytenmischkultur wird auch beim Schwein beschrieben (VAIMAN et al., 1970 a).

Die Lymphoblastentransformation wird durch Ia- Antigene bewirkt, die an B- Zellen, aber auch an nicht- lymphoiden Gewebszellen des Schweines nachgewiesen wurden (PAWELEC et al., 1979).

B- Lymphozyten spezifische Antigene wurden beim Menschen mit Antilymphozytenseren, die mit Thrombozyten absorbiert waren, nachgewiesen. Diese serologisch nachgewiesenen Antigene waren mit den Lymphozytenantigenen des MLC- Testes identisch (VAN ROOD et al., 1975).

Auch beim Schwein konnte VAIMAN et al. (1975) mit entsprechend absorbierten Immunsereen B- Lymphozyten spezifische Antigene feststellen, die ebenfalls mit den im MLC- Test nachgewiesenen Antigenen korrespondierten.

Die Herstellung von B- Lymphozyten spezifischen Antisereen erfolgte durch Absorption mit Thrombozyten. Diese besitzen auf ihrer Membran Antigene, die alle kernhaltigen Zellen tragen. Nur B- Lymphozyten spezifische Antigene fehlen auf den Thrombozyten. So werden bei Absorption von Antilymphozytenseren mit Thrombozyten alle, außer den B- Lymphozyten spezifischen, Antikörper entfernt.

Mit spezifischen Thrombozyten- absorbierten Antisereen konnten Ia- assoziierte Antigene des Schweines auf B- Lymphozyten (BINNS et al., 1979), wie auch auf Nierenzellen, Makrophagen und auf Schweinespermatozoen nachgewiesen werden (VAIMAN et al., 1978 b).

2.4. Der Histokompatibilitätskomplex beim Schwein

Der Haupthistokompatibilitätskomplex des Schweines SLA (= Swine Lymphocyte Antigens) ist wie der H-2-Komplex der Maus und das HLA- System des Menschen aus einer noch unbekannten Anzahl von eng verknüpften Genen zusammengesetzt (VAIMAN et al., 1970 b).

Während ein oder mehrere Gene direkt die gemischte Lymphozytenreaktion in der Lymphozytenmischkultur kontrollieren, kodieren andere Gene die serologisch determinierten Antigene (VAIMAN et al., 1973).

Diese Histokompatibilitätsantigene konnten beim Schwein an allen Lymphozyten der Lymphknoten und des peripheren Blutes, jedoch nicht an Erythrozyten nachgewiesen werden.

Der Genkomplex, der für das Histokompatibilitäts-system des Schweines verantwortlich ist, wurde mit spezifischen, gegen SLA- Antigene gerichtete Immunseren identifiziert.

Gegenwärtig sind eine Vielzahl von SLA- Antigenen bekannt, die in internationalen Vergleichsuntersuchungen ihren entsprechenden Loci noch zugeordnet

werden müssen (VAIMAN et al., 1970 b; OHSHIMA et al., 1971; SCHMID und CWIK, 1972; ARNOUX et al., 1974; HRUBAN et al., 1974; SACHS et al., 1976; LEIGHT et al., 1977; MUKOYAMA et al., 1977; CHARDON et al., 1978; VAIMAN et al., 1978 a; VAIMAN, 1979). Nach VAIMAN (1970 a; 1973) besteht eine Verbindung zwischen den Genen, die die SLA- Antigene und die gemischte Lymphozytenreaktion kontrollieren. Ebenso wurde erkannt, daß B- Lymphozyten spezifische Antigene (LD) von Genen der MLR- Region determiniert werden (VAIMAN et al., 1970 a). Das SLA- System des Schweines stellt ein außerordentlich komplexes und polymorphes immungenetisches System dar. Die einzelnen SLA- Antigene sind genetisch mehreren Loci zuzuordnen (WHITE et al., 1973; VAIMAN et al., 1974; HRUBAN et al., 1977; HRUBAN et al., 1978).

Beim Schwein vorhandene Ir- Gene (= Immune Response) kontrollieren die Ia- Antigene (= Immune Antigens). VAIMAN (1979) ordnete die Ia- Antigene mindestens einem Locus zu, der sich in der Nachbarschaft der D- Region des SLA- Systems befindet. Wie schon bei Maus und Mensch, sind diese Lympho-

zyten- determinierten Antigene nur auf wenigen Zellen nachzuweisen. Hauptsächlich wurden sie auf B- Lymphozyten (BINNS et al., 1979), aber auch auf Spermazellen (JILEK und VESELSKY, 1972) und Epidermiszellen gefunden (PAWELEC et al., 1979).

Chemisch wird das Ia- Antigen des Schweines durch eine schwere Kette mit dem Molekulargewicht 32.000 Dalton und durch eine leichte Kette mit dem Molekulargewicht 25.000 Dalton charakterisiert (LUNNEY und SACHS, 1978).

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an 326 Schweinen der Deutschen Landrasse durchgeführt.

Zur Trennung von B- und T- Lymphozyten durch Spontanrosettierung, in der Nylonwollensäule und in antikörperbeschichteten Petrischalen wurden in den Vorversuchen die Lymphozyten aus dem Blut und den Lymphknoten von 118 geschlachteten Schweinen gewonnen.

Im Mikrozytotoxizitätstest wurden 208 Schweine auf ihre B- Lymphozyten spezifischen Antigene untersucht.

Für die Familienuntersuchungen standen 70 Tiere des Lehr- und Versuchsgutes Oberschleißheim der tierärztlichen Fakultät der Universität München zur Verfügung. Es handelte sich um 13 Familien mit 5 Ebern und 13 Muttersauen mit 42 Nachkommen. Die Blutentnahme bei den Ferkeln erfolgte in der 6. bis 8. Lebenswoche.

Für den Spontanrosettentest wurden die Erythrozyten von 18 Merinolandschafen eingesetzt.

Der Thrombozytenpool für die erste Absorption der Antilymphozytenserum wurde aus 90 Liter Blut von

60 Schlachtschweinen gewonnen. 60 % dieser Tiere waren männlich.

Zur zweiten Absorption der Immunseren wurden die Thrombozyten von 56 geschlachteten Schweinen und einer Blutmenge von 76 Liter gesammelt. Davon waren 72 % der Tiere männlich.

Durch den hohen Anteil an Thrombozyten männlicher Tiere im Absorptionsmaterial wurde gleichzeitig gewährleistet, daß eventuell in den Seren vorhandene Antikörper, die gegen H-Y Antigene gerichtet waren, absorbiert wurden (GOULMY et al., 1977).

Zur weiteren Fraktionierung der B- Lymphozyten spezifischen Antigene wurden B- Lymphozyten aus den Lymphknoten von geschlachteten Schweinen zur Absorption verwendet.

3.2. Gewinnung von Antilymphozytenserum

Die für die Lymphozyten- Typisierung eingesetzten Schweine- Antilymphozytenserum waren Isoimmunserum, die im Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim durch gezielte Immunisierung von Schweinen mit Lymphozyten gewonnen wurden.

Vorzugsweise wurden Wurfgeschwister immunisiert, die zuvor auf ihre SD- Antigene typisiert wurden. Ebenso wurden Tiere immunisiert, deren Faktoren serologisch entweder identisch waren oder der Lymphozyten- Donor weniger Faktoren aufwies als der Rezipient.

Durch die Immunisierung wurde angestrebt, Antikörper zum Nachweis bisher noch unbekannter Lymphozytenantigene zu gewinnen. Bei Wurfgeschwistern, die im SIA- System identisch sind, kann mit Unterschieden bei den LD- Antigenen gerechnet werden, die nach Immunisierung zur Bildung von Antikörpern, die gegen B- Lymphozyten spezifische Antigene gerichtet sind, führen.

Die Technik der Immunisierung zwischen Wurfgeschwistern bestand darin, daß isolierte Lymphozyten aus den Mesenteriallymphknoten von zuvor typisierten,

geschlachteten Schweinen in drei Portionen im Abstand von 10 Tagen dem Empfänger intramuskulär verabreicht wurden. 10 Tage nach der letzten Immunisierung wurde der Empfänger geschlachtet und das Immunserum gewonnen.

Die auf diese Weise erhaltenen Seren wurden in Versuchen auf das Vorhandensein von SLA- und LD- Antikörpern geprüft. Isoimmunseren mit Reaktionen im Bereich von 50 % geschädigter Lymphozyten wurden mit Thrombozyten absorbiert. Damit wurde gewährleistet, daß eventuell vorhandene SLA-Antikörper entfernt wurden.

Zur Absorption wurden 2 Milliliter Isoimmunserum mit 0,5 Milliliter Thrombozytensediment vermischt und 30 Minuten bei Zimmertemperatur und danach 30 Minuten bei 4°C absorbiert. Dieser Vorgang wurde mit 0,5 Milliliter frischem Thrombozytensediment aus dem selben Pool wiederholt. Nach dem Abzentrifugieren wurde das absorbierte Serum in der Ultrazentrifuge bei 30.000 Umdrehungen/ Minute geklärt und in kleinen Portionen bei -20°C eingefroren.

Die zur Absorption benötigten Thrombozyten wurden aus stabilisiertem Blut von Schlachthofschweinen

gewonnen. Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 400 g konnten die Thrombozyten mit dem Plasma abgezogen und durch mehrere Waschvorgänge gereinigt werden. Die Thrombozyten wurden im Citratstabilisator konserviert und bei 4°C bis zur Absorption aufbewahrt.

Zur Fraktionierung der B- Lymphozyten spezifischen Antisera wurden diese Sera mit B- Lymphozyten adsorbiert. Die Adsorption erfolgte in antikörperbeschichteten Plastikröhrchen.

13- Milliliter- Plastikröhrchen wurden mit einer Suspension von Anti- Schwein- Ig und 0,05 M TRIS, pH 9,5, und einer Antikörperkonzentration von 5 Mikroliter/ Milliliter beschichtet.

Von den aus Schweinelymphknoten gewonnenen, zuvor typisierten Lymphozyten, wurden drei Milliliter mit einer Dichte von 30×10^9 Zellen/ l in die beschichteten Plastikreagenzgläser gefüllt und bei 4°C inkubiert.

Jeweils nach 20 Minuten wurden die Röhrchen um 90° gedreht, bis sie innen vollständig mit B- Lymphozyten ausgekleidet waren. Nach Abgießen der Lymphozytensuspension wurden die Röhrchen zweimal mit PBS gespült, um die nicht haftenden Zellen zu entfernen. Dann wurden je ein Milliliter Immuns Serum

serum in die mit B- Lymphozyten beschichteten
Röhrchen gegeben.

Die Absorption wurde 30 Minuten in verschlossenen
Reagenzgläsern in einem Schüttelapparat durchge-
führt. Danach wurden die Seren abzentrifugiert und
in kleinen Portionen bei -20°C eingefroren.

3.3. Lymphozytenisolierung

Zur Gewinnung von reinen Lymphozyten wurde das Verfahren von OTTO und SCHMID (1970) modifiziert.

Um für die nachfolgenden Trennverfahren in B- und T- Lymphozyten ausreichend Lymphozyten zu erhalten, wurden mindestens 10 Milliliter stabilisiertes Schweineblut benötigt.

Folgender Stabilisator zur Gerinnungshemmung wurde im Verhältnis 1 : 4 dem Frischblut zugesetzt:

Natriumchlorid	2,5 g
Natriumcitrat	30,0 g
Natriumcyanid	0,4 g
Streptomycin	0,5 g
Aqua dest.	ad 1000,0 ml

Der Dichtegradient "Uromiro" (Dr. F. Köhler Chemie, Alsbach) wurde mit Aqua dest. auf die Dichte 1,076 eingestellt.

Um die Lymphozytenausbeute besonders bei geringer Blutmenge zu vergrößern, wurde das stabilisierte Schweineblut 1 : 2 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.

5 Milliliter des verdünnten Blutes wurden vorsichtig auf 3 Milliliter Uromiro überschichtet.

Der Ansatz wurde bei 1000 g 15 Minuten lang zentrifugiert. Dabei bildete sich in der Interphase ein weißer, lymphozytenreicher Ring, der mit einer Pasteurpipette abgezogen wurde.

Danach wurden die Lymphozyten jeweils zweimal 10 Minuten bei 400 g in der Zentrifuge mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

Durch die Waschvorgänge wurden die Thrombozyten und die Reste des Uromiro- Dichtegradienten entfernt.

Für die Trennungsvorgänge in B- und T- Lymphozyten und für den Mikrozytotoxizitätstest wurden die Lymphozyten auf eine bestimmte Zellzahl mit folgender Formel eingestellt:

$$XV = \frac{V \times VZ \text{ in mm}^3}{BZ \text{ in mm}^3}$$

XV = Verdünnungsvolumen

V = Vorhandenes Volumen der Lymphozytensuspension

VZ = Vorhandene Zellzahl der Lymphozytensuspension

BZ = Beabsichtigte Zellzahl

3.3.1. Methoden zur Gewinnung von B- und T- Lymphozyten beim Schwein

Die Trennung von isolierten Lymphozyten in B- und T- Lymphozyten wurde mit der Spontanrosettierung, in der Nylonwollensäule und mit antikörperbeschichteten Petrischalen durchgeführt.

3.3.1.1. Trennung durch Rosettierung mit Schaferythrozyten

Nach einer Methode, die ALBERT et al. (1977 und 1979) für die Lymphozyten des Menschen beschrieben hat, konnten vom Schwein durch Spontanrosettierung Lymphozytenfraktionen gewonnen werden, in denen B- und T- Lymphozyten angereichert waren.

Die Schweinelymphozyten wurden aus stabilisiertem Blut nach der bereits beschriebenen Methode isoliert. Sie wurden in Hank's¹ Lösung resuspendiert und auf 2×10^9 Zellen/ l eingestellt.

Die Schaferythrozyten wurden zweimal 10 Minuten bei 650 g in der Zentrifuge gewaschen. Danach wurden sie mit Hank's Lösung zu einer 2,5 %igen Suspension verdünnt.

1. Hank's Lösung, SEROMED^R, München

Neuraminidase¹ wurde in einer Konzentration von 12,5 Einheiten pro Milliliter Schafererythrozytensuspension beigemischt. Das entsprach 0,1 Milliliter unverdünnte Neuraminidase auf 10 Milliliter 2,5 %ige Erythrozytensuspension.

Der Ansatz wurde in gut verschlossenen Reagenzgläsern 25 Minuten im Rotor bei 60 Umdrehungen pro Minute und bei Zimmertemperatur durchgemischt.

Die neuraminidasevorbehandelten Schafererythrozyten wurden dreimal 7 Minuten in der Zentrifuge bei 650 g gewaschen und dann mit Hank's Lösung auf 2,5 % verdünnt.

Bei der Vorbereitung des Ansatzes für die Rosettierung wurden gleiche Volumina der auf 2×10^9 Zellen/ l eingestellten Lymphozytensuspension mit der 2,5 %igen neuraminidasevorbehandelten Schafererythrozytensuspension vermischt. Das ergab ein Verhältnis der Erythrozyten zu den Lymphozyten von 30 : 1.

Der Rosettierungsansatz wurde vorsichtig durch Umkippen des Reagenzglases gemischt und sofort auf den Uromiro- Dichtegradienten mit der Dichte 1,076 überschichtet. Es wurden 5 Milliliter Lymphozyten-

1. Neuraminidase von *Vibrio cholerae*, 5,0 units/mg
Charge- Nummer 30294, SERVA

Erythrozytensuspension auf 3 Milliliter Uromiro gegeben. Da B- Lymphozyten eine erhöhte Affinität zu Glas aufweisen, wurden nur Plastikreagenzgläser verwendet.

Zur Rosettierung wurden die auf Uromiro überschichteten Versuchsansätze zunächst 15 Minuten bei Zimmertemperatur, anschließend noch 45 Minuten bei 4°C inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Ansätze 15 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Die Rosetten sedimentierten, die B- Lymphozyten bildeten in der Interphase des Dichtegradienten einen weißen Ring, der sorgfältig mit einer Pasteurpipette abgezogen wurde.

Nach zweimaligem Waschen, jeweils 7 Minuten bei 400 g, wurden die B- Lymphozyten für den Mikrozytotoxizitätstest mit Hank's Lösung auf 2×10^9 Zellen/ l eingestellt.

Die T- Zellrosetten aus dem Sediment wurden durch leichtes Aufschütteln resuspendiert. Die Erythrozyten wurden mit 0,85 %igem Ammoniumchlorid hämolytisiert. Die T- Lymphozyten wurden zweimal 7 Minuten bei 400 g in der Zentrifuge mit Hank's Lösung gewaschen und auf 2×10^9 Zellen/ l für den Mikrozytotoxizitätstest verdünnt.

3.3.1.2. Trennung in der Nylonwollensäule

Zur Trennung von T- und B- Lymphozyten in der Nylonwollensäule wurden die Verfahren von JULIUS (1973), WERNER et al. (1977) und CICHON (1979) modifiziert. Im Gegensatz zu diesen Methoden wurde auf eine Vorbehandlung der Nylonwolle¹ mit Salzsäure verzichtet. Die Lymphozyten wurden nur in Hank's Lösung ohne Zugabe von Serum suspendiert. Die Modifikation bestand besonders darin, die Menge der Nylonwolle und die Anzahl der Lymphozyten im Trennungsverfahren zu reduzieren.

Aus 15 Millilitern stabilisiertem Schweineblut wurden Lymphozyten isoliert und auf 20×10^9 Zellen/ l eingestellt.

Eine 2-Milliliter- Plastikspritze² wurde mit 0,1 Gramm Nylonwolle gefüllt. Es wurde darauf geachtet, daß die Nylonwolle locker eingeschichtet wurde. Mit dem Spritzenstempel wurde die Nylonwolle bis zur Marke 1-Milliliter komprimiert.

Die Nylonwollensäule wurde danach mit 10 Milliliter auf 37°C angewärmter Hank's Lösung gespült. Darauf wurden beide Enden der Spritze mit Parafilm³ ver-

1. Leuko-PAK, FENWAL LABORATORIES

2. 2-ml Injekt, DIN 13098 TYP A, BRAUN MELSUNGEN

3. Parafilm^R, AMERICAN CAN COMPANY NEENAH, WISCONSIN USA

schlossen und die Plastikspritze vertikal mit der Spitze nach unten für 30 Minuten bei 37°C in den Brutschrank gestellt.

Nach der Inkubation wurde die Nylonwollensäule mit einem Milliliter der Lymphozytensuspension beschickt. Während der Eingabe der Lymphozytensuspension wird die Hank's Lösung aus der Säule verdrängt. Unmittelbar danach wurde die Spritze auf beiden Seiten verschlossen, um das Auslaufen der Zellsuspension zu verhindern. Die gefüllte Spritze wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die Spritze mit einer 21 G Kanüle¹ versehen. Mit 20 Milliliter auf 37°C vorgewärmter Hank's Lösung wurden die T- Zellen ausgespült und aufgefangen. Dabei war darauf zu achten, daß die Spritze immer gefüllt war und die Auslaufgeschwindigkeit der Flüssigkeit 10 Tropfen/ 4 Sekunden betrug. Dies wurde durch kontinuierliches Nachfüllen erreicht.

Nach Ausspülen der T- Lymphozyten wurde die Kanüle abgenommen, der Spritzenstempel aufgesetzt, die Spritzenspitze mit dem Finger verschlossen und die feuchte Nylonwolle vorsichtig bis zur 1-Milliliter-

1. Sterikan-Kanüle, 0,80 x 38 mm, 21 G, BRAUN MEL-
SUNGEN

Marke komprimiert.

Mit 20 Milliliter 37°C warmer Hank's Lösung wurde die Wolle nochmals gespült, ohne jedoch der Spritze eine Kanüle aufzusetzen. Mit einer auf 10 Tropfen/ 2 Sekunden erhöhten Durchlaufgeschwindigkeit und durch die leichte Kompression der Säule mit dem Spritzenstempel, wurde eine Loslösung der an der Nylonwolle anhaftenden B- Lymphozyten gewährleistet. Die B- Lymphozyten wurden in Plastikreagenzgläsern gesammelt.

Die isolierten Zellen wurden zweimal 10 Minuten bei 400 g zentrifugiert und auf ihre Testdichte eingestellt.

Die Anreicherung der B- und T- Lymphozyten wurde im Spontanrosettentest geprüft.

3.3.1.3. Trennung in antikörperbeschichteten Petrischalen

Eine weitere Methode zur Fraktionierung von B- und T- Lymphozyten ist das Trennverfahren in antikörperbeschichteten Plastikpetrischalen.

Als Grundlagen dienten die Methoden von MAGE et al. (1977) und WYSOCKI und SATO (1978).

Der erste Arbeitsgang bestand im Beschichten der Plastikpetrischalen¹ mit Antikörpern.

Dabei wurden folgende Reagenzien eingesetzt:

TRIS 0.05 M:

Bei einem Molekulargewicht von 121,14 entsprechen 0,05 M TRIS $\hat{=}$ 6,05 Gramm TRIS auf 1 l Aqua dest. Zum Einstellen auf pH 9,5 wird 0,1 n HCl verwendet.

PBS (Phosphate Buffered Saline);

NaCl	45	g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	1,38	g
Aqua dest.	ad	5000 ml
Phosphorsäure 8,5 %	0,5	ml
pH 7,3		

Lyophilisiertes Kaninchen- Anti- Schwein- Immunglobulin G² mit der Antikörperkonzentration von 3,6 mg/ Milliliter wurde in zwei Milliliter Aqua bidest. gelöst.

1. LUX - Gewebekulturschale, 60 x 15 mm, Standard, SEROMED^R

2. Kaninchen-Anti-Schwein-IgG lyophilisiert, MILES-YEDA Ltd., Kiryat Weizmann, Rehovot, Israel

Dann wurde es mit natürlichem Kaninchen IgG¹ im Verhältnis 1 : 10 vermischt und mit 0,05 M TRIS, pH 9,5, zu einer Antikörperkonzentration von 5 Mikrogramm/ Milliliter verdünnt.

5 Milliliter der Suspension wurden bläschenfrei in eine Plastikgewebekulturschale mit Durchmesser 60 mm und Höhe 15 mm gegossen. Durch Schwenken der Schale wurde eine vollständige Bedeckung des Bodens mit der Suspension erreicht. Der Ansatz wurde 40 Minuten in der abgedeckten Petrischale bei Zimmertemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die TRIS- Lösung abgegossen und die Petrischale 4 mal vorsichtig mit PBS gespült.

Die antikörperbeschichteten Petrischalen können bei - 18°C längere Zeit bei voller spezifischer Wirksamkeit der Antikörperbeschichtung aufbewahrt werden. Besonders zu beachten ist das vollständige Abgießen der PBS- Lösung, da die sonst entstehenden Eiskristalle die Antikörper abheben.

1. Kaninchen- IgG, SEROMED^R

Im eigentlichen Trennungsvorgang in B- und T- Zellen wurden 10×10^9 Lymphozyten/ l in 1,5 Milliliter PBS mit einem Tropfen fetalem Kalbsserum¹ suspendiert und bläschenfrei in die beschichtete Plastikpetrischale eingebracht.

Durch leichtes Schwenken der Schale wurde die Zellsuspension auf dem Schalenboden verteilt. Die gefüllte Petrischale wurde abgedeckt und bei 4°C inkubiert.

Nach 40 Minuten wurde durch erneutes Schwenken der Schale eine Umverteilung der Lymphozytensuspension bewirkt, um noch freie Bindungsstellen auf der Petrischale für B- Lymphozyten zu besetzen.

Nach weiteren 30 Minuten Inkubation bei 4°C wurde die nichthaftende, mit T- Zellen angereicherte Zellfraktion in Reagenzgläser abgegossen. Die Petrischale wurde noch 5 mal mit je 5 Milliliter PBS unter vorsichtigem Schwenken gespült und die Zellen im Reagenzglas aufgefangen.

Zur Gewinnung der B- Lymphozyten, die wie ein weißer Hauch auf der Schale haften, wurde die Kulturschale mit 15 Milliliter PBS gefüllt. Mit der Pasteurpipette wurde der Ansatz mehrmals durchmischt.

1. Fetales Kalbsserum, SEROMED^R

Durch die mechanische Einwirkung des Flüssigkeitsstromes wurden die haftenden Zellen abgelöst und konnten in Plastikreagenzgläsern gesammelt werden. Die Lymphozyten wurden einmal 10 Minuten bei 400 g zentrifugiert und auf eine Zellzahl von 2×10^9 Lymphozyten/ l für den Mikrozytotoxizitätstest eingestellt.

3.4. Serologischer Nachweis von B- Lymphozyten spezifischen Antigenen im mikrozytotoxischen Test

Der Mikrozytotoxizitätstest wurde zum Nachweis der Membranantigene der Lymphozyten und zur Prüfung der Antilymphozytenseren auf ihre zytotoxischen Antikörper eingesetzt. Dem Test wurden die Arbeiten von TERASAKI und McCLELLAND (1964), KISSMEYER-NIELSEN und KJERBYE (1967) und UNGER et al. (1971) zu Grunde gelegt.

Der mikrozytotoxische Test wurde in Møller Coats Mikrokammern ¹ durchgeführt.

Die Mikrokammern wurden bläschenfrei mit Decköl² gefüllt.

Mit der Hamilton- Mikroliterspritze wurden in die Kammer ein Mikroliter Serum und ein Mikroliter einer auf 2×10^9 Zellen/ l eingestellten Lymphozytenpopulation einpipettiert. Die eingesetzten Seren wurden im Testansatz mit nicht getrennten Lymphozyten, angereicherten T- Lymphozyten und B- Lymphozyten von jedem Tier auf ihre B- Lymphozyten spezifischen Antikörper geprüft.

1. Møller Coats, Mikrokammern, Moss, Norway

2. Biotest Serum-Institut GmbH, 6 Frankfurt/Main

In die oberste Reihe wurden die nicht getrennten Lymphozyten eingegeben, in die mittlere Reihe der Kammer die B- Lymphozyten und in die unterste Reihe die T- Lymphozyten.

Der Versuchsansatz wurde vorsichtig geschüttelt und eine Stunde bei 27°C inkubiert.

Die zytotoxische Reaktion ist komplementabhängig. Es wurde unverdünntes Kaninchen- Komplement benutzt, das mit Schweineerythrozyten absorbiert war. Drei Teile Kaninchen- Serum wurden mit einem Teil Schweineerythrozyten 20 Minuten bei Zimmertemperatur und anschließend 20 Minuten bei 4°C absorbiert. Es wurde darauf geachtet, daß 1/3 der Schweineerythrozyten von A- positiven Merkmalsträgern stammten. Speziesspezifische, gegen das Schwein gerichtete Antikörper im Kaninchen- Serum können durch die Absorption mit Schweineerythrozyten eliminiert werden (VAIMAN et al., 1970 b).

Darüber hinaus lassen sich im Kaninchen- Serum vorhandene Antikörper der Spezifität Anti- A mit dem Anteil A- positiver Schweineerythrozyten entfernen. Das frisch gewonnene Komplement wurde unverzüglich in kleinen Portionen abgefüllt und für den einmaligen Gebrauch bei -20°C eingefroren.

Für den Mikrozytotoxizitätstest wurde dem Versuchsansatz ein Mikroliter frisch aufgetautes Komplement zugesetzt. Der Ansatz wurde geschüttelt und 2 1/2 Stunden bei 27°C bebrütet.

Die Zytolyse wurde im Vitalitätstest mit Trypanblau sichtbar gemacht. Er beruht auf dem Prinzip, daß die toxisch geschädigten Zellmembranen für Trypanblau durchlässig sind. Die intakte Zellmembran ist für den Farbstoff impermeabel.

Die Trypanblaulösung wurde wie folgt angesetzt:

Mit Aqua dest. wurde zuerst eine 2 % ige Trypanblaulösung¹ hergestellt.

Ein Milliliter dieser Stammlösung wurde dann zur Einstellung einer Isotonie mit einem Milliliter 1,8 %iger Kochsalzlösung vermischt. Nach 10 Minuten Zentrifugieren bei 1500 g wurde vom Überstand 0,6 Milliliter mit 1,5 Milliliter physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Zur Entfernung noch vorhandener partikulärer Verunreinigungen wurde die Trypanblaulösung noch einmal 10 Minuten bei 1500 g zentrifugiert. Der Überstand diente als Gebrauchslösung.

1. Trypanblau für Mikroskopie 4856, Carl Roth GKG

Von der jeweils frisch angesetzten Trypanblaulösung wurden 0,5 Mikroliter in den Testansatz einpipettiert. Nach einer weiteren Inkubation von 10 Minuten wurde dem Reaktionsansatz ein Mikroliter 37 %iges filtriertes Formaldehyd (pH 7,9) zugesetzt. Das Formalin fixierte sofort die zytotoxische Reaktion.

Die Membran der im Mikrozytotoxizitätstest nicht geschädigten Zellen wird durch das Formalin gehärtet. Die Membran zytotoxisch geschädigter Zellen wird ebenfalls gehärtet und unterliegt somit keinem weiteren Verfall. Der Vorteil dieser Formalinfixierung besteht darin, daß die Reaktionen des Zytotoxizitätstestes unverändert bleiben und noch nach längerer Zeit ablesbar sind.

Die Reaktionsstärke der Zytolyse wurde nach folgendem Schema ausgewertet:

unter 10 %	=	negativ
10 - 20 %	=	1
20 - 30 %	=	2
30 - 50 %	=	3
50 - 70 %	=	4
über 70 %	=	5

Zur Vermeidung von Fehlerquellen wurde in jeder Mikrokammer für jede Zellfraktion eine Testserum-freie Kochsalzkontrolle mitgeführt. Damit konnten unspezifische Reaktionen erkannt werden.

Im mikrozytotoxischen Test wurden die Testseren in Verdünnungsreihen eingesetzt. Dadurch wurden die Antikörpertiter der Seren ermittelt und gleichzeitig bestand eine weitere Kontrolle der Spezifität der Reaktion.

Zur weiteren Absicherung der Ergebnisse wurde der Test in doppelter Ausführung angefertigt.

4. Ergebnisse

4.1. B- und T- Lymphozyten und ihre Fraktionierung

Zur Trennung von B- und T- Lymphozyten wurden drei Methoden angewandt, die Spontanrosettierung mit Schafererythrozyten, die Fraktionierung in der Nylonwollensäule und die Trennung in antikörperbeschichteten Petrischalen.

4.1.1. Trennung durch Spontanrosettierung

B- und T- Lymphozyten des Schweines wurden sowohl aus Lymphknoten, als auch aus peripherem Blut mit der Methode der Spontanrosettierung getrennt.

Die Spontanrosettenbildung von T- Zellen wurde in 42 Vorversuchen geprüft.

Dabei betrug der Prozentsatz der beobachteten Spontanrosetten durchschnittlich 35,3 %. Der niedrigste Wert lag bei 29 %, der höchste Wert bei 49 %.

Bei wiederholter Rosettierung von Lymphozyten des gleichen Schweines mit den Erythrozyten der selben Schafe, lag die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei 95 %.

Es wurde festgestellt, daß der prozentuale Anteil der gebildeten Rosetten von individuellen Eigenschaften der jeweils verwendeten Schafererythrozyten

abhängig ist. Die Erythrozyten verschiedener Schafe und die Lymphozyten eines Schweines führten zu unterschiedlichen Prozentsätzen an Spontanrosetten. Die Erythrozyten männlicher Schafe wiesen eine ausgeprägtere Rosettenbildung auf, als die Erythrozyten von weiblichen Tieren und Schafen, die jünger als 6 Monate waren.

Die Vitalität der nach Spontanrosettierung gewonnenen B- Lymphozyten betrug 98 %.

Die mit dieser Methode gewonnenen T- Lymphozyten zeigten unterschiedliche Prozentsätze von 5 - 30 % an geschädigten Zellen auf, die durch die erforderliche Hämolyse mit Ammoniumchlorid bedingt waren.

4.1.2. Trennung in der Nylonwollensäule

Die Fraktionierung von B- und T- Lymphozyten in der Nylonwollensäule wurde im Vorversuch an 54 Schweinen untersucht.

Von den eingegebenen Zellen wurden durchschnittlich 52 % zurückgewonnen. Der niedrigste Wert lag bei 40 %, der höchste Wert betrug 64 %.

Von den zurückgewonnenen Zellen waren $28,6 \% \pm 3,8$ B- Lymphozyten. Die Anzahl der T- Lymphozyten lag bei $65,1 \% \pm 3,6$.

Während die T- Zellenfraktion höchstens 5 % geschädigte Zellen aufwies, betrug der Prozentsatz an geschädigten Zellen bei den B- Lymphozyten im Durchschnitt 15 %.

Es wurde darauf geachtet, daß die Nylonwatte mit einer Lymphozytenzahl beschickt wurde, die zwischen 10×10^9 Lymphozyten/ l und 20×10^9 Lymphozyten/ l lag.

Wurde eine größere Zellmenge eingegeben, stieg der Anteil der die Wolle passierenden Zellen unverhältnismäßig hoch an. Dies wies darauf hin, daß die Bindungskapazität der Nylonwolle für B- Lymphozyten überschritten war.

In der T- Lymphozytenfraktion befanden sich nach der Nylonwolle-Trennung manchmal noch Thrombozyten, die nicht an der Nylonwolle haften. Sie konnten durch einen Waschvorgang in der Zentrifuge bei einer Beschleunigung von 100 g aus der Zellsuspension entfernt werden.

Die B- Lymphozytenfraktion war immer frei von Thrombozyten.

Zur Kontrolle der Anreicherung von B- und T- Lymphozyten wurde die Spontanrosettierung eingesetzt.

Die nicht fraktionierten Lymphozyten und die in der Nylonwolle getrennten B- und T- Lymphozyten wurden

der Spontanrosettierung unterzogen.

Die Zahl der Spontanrosetten von der in der Nylonwolle-trennung erhaltenen T- Zellenfraktion war bis zu dreimal höher, als bei der nicht getrennten Lymphozytenfraktion.

Der Prozentsatz der Spontanrosetten bei den aus der Nylonwollensäule gewonnenen B- Lymphozyten lag durchschnittlich 28 % unter der Anzahl der Spontanrosetten aus den nicht getrennten Lymphozyten.

Damit wurde der Beweis erbracht, daß es sich bei den getrennten Lymphozytenfraktionen um angereicherte T- und B- Lymphozytenpopulationen handelte.

4.1.3. Trennung in antikörperbeschichteten Petrischalen

Die Trennung von B- und T- Lymphozyten in antikörperbeschichteten Plastikpetrischalen wurde im Vorversuch an Lymphozyten des peripheren Blutes von 22 Tieren untersucht.

Es wurde geprüft, welche Verdünnung von Kaninchen-Anti- Schwein- Immunglobulin mit natürlichem Kaninchen- Immunglobulin die größte Ausbeute an B- Lymphozyten erbrachte.

Zum Beschichten der Plastikpetrischalen wurde Kaninchen- Anti- Schwein- Ig unverdünnt und mit natürlichem Kaninchen- Ig im Verhältnis 1 : 5, 1 : 10 und 1 : 20 verdünnt eingesetzt.

Die beste Zellausbeute erhielt man bei der Verdünnung 1 : 10 (Tabelle 2), da von den eingegebenen Lymphozyten durchschnittlich 65,7 % zurückgewonnen wurden. Der geringste Prozentsatz an wiedergewonnenen Zellen betrug 49,8 %, der höchste 78,6 %.

Von den wiedergewonnenen Lymphozyten lag der Anteil der T- Zellen durchschnittlich bei 46,5 %, die Anzahl der B- Zellen betrug im Durchschnitt 53,3 %. Bezogen auf die eingegebenen Zellen ergab der durchschnittliche Prozentsatz an T- Lymphozyten 30,6 %, der der B- Lymphozyten 34,9%.

Beim Einsatz von unverdünntem Anti- Schwein- Ig wurden insgesamt nur $39,8 \% \pm 9,6$ Zellen zurückgewonnen. Davon betrug der Anteil der T- Lymphozyten im Durchschnitt 60,3 % und der Prozentsatz der B- Lymphozyten 39,7 %. Das ergab bezogen auf die eingegebenen Lymphozyten durchschnittlich 23,9 % T- Lymphozyten und 15,8 % B- Lymphozyten. Die B- Zellfraktion wies bis zu 20 % geschädigte Lymphozyten auf. An der Petrischale hafteten noch Zellen

Tabelle 2

Trennung von B- und T- Lymphozyten in antikörperbeschichteten Petrischalen

Verdünnung von Anti-Schwein-Ig mit Kaninchen-Ig	Prozentualer Anteil von Lymphozyten bezogen auf die zurückgewonnenen Zellen				Prozentualer Anteil von Zellen bezogen auf die eingegebene Zellzahl	
	Durchschnittliche Lymphozytenausbeute in %	Durchschnittliche T-Lymphozytenausbeute in %	Durchschnittliche B-Lymphozytenausbeute in %		Durchschnittliche Gesamtausbeute an T-Lymphozyten in %	Durchschnittliche Gesamtausbeute an B-Lymphozyten in %
unverdünn	39,8	60,3	39,7		23,9	15,8
1 : 5	48,1	59,6	40,2		28,7	19,3
1 : 10	65,7	46,5	53,3		30,6	34,9
1 : 20	68,2	61,2	38,9		41,7	26,5

mit einer auch mit bloßem Auge erkennbaren Dichte, die selbst bei starkem Durchmischen der Suspensionsflüssigkeit nicht zu lösen waren.

Bei der Verdünnung 1 : 5 betrug die Anzahl der wiedergewonnenen Zellen $48,1 \% \pm 9,8$. Davon waren durchschnittlich $59,6 \%$ T- Lymphozyten und $40,2 \%$ B- Lymphozyten. Bezogen auf die eingegebenen Zellen fielen durchschnittlich $28,7 \%$ auf die T- Lymphozyten und $19,3 \%$ auf die B- Lymphozyten. Auch bei dieser Verdünnungsstufe blieben auf der Petrischale vereinzelt Zellen irreversibel haften.

Bei der Verdünnung 1 : 20 ergaben sich $68,2 \% \pm 11,1$ zurückgewonnene Lymphozyten. Sie teilten sich in durchschnittlich $61,2 \%$ T- Zellen und $38,9 \%$ B- Zellen auf. In Beziehung auf die eingegebenen Lymphozyten kamen auf die T- Lymphozyten im Durchschnitt $41,7 \%$ und auf die B- Lymphozyten $26,5 \%$. Bei dieser Verdünnung fand keine ausreichende Bindung der B- Lymphozyten an die Petrischale mehr statt, so daß sich die Zellen zu leicht lösten.

Im Trennungsverfahren wurde eine Zelldichte von 10×10^9 Lymphozyten/ l eingesetzt. Je mehr Zellen eingegeben wurden, desto geringer war der prozentuale Anteil der zurückgewonnenen Lymphozyten.

Gleichzeitig wurde die Bindungskapazität der Anti-Immunglobuline für B- Lymphozyten überschritten, wodurch eine Auftrennung in B- und T- Lymphozyten nicht mehr gewährleistet war.

Die Trennung in B- und T- Zellen wurde anhand der unterschiedlichen Reaktionsstärken im Zytotoxizitätstest nachgewiesen.

Im Vergleich zu den nicht getrennten Lymphozyten und der T- Zellfraktion wiesen die B- Zellen mit B- Lymphozyten spezifischen Antiseren eine verstärkte Reaktion auf. Ebenso konnten Reaktionen ausschließlich bei den B- Zellen festgestellt werden, die bei den nicht getrennten Lymphozyten und bei den T- Zellen ausblieben.

4.2, Serologischer Nachweis von B- Lymphozyten spezifischen Antigenen beim Schwein

Im ersten Vorversuch zum serologischen Nachweis von B- Lymphozyten spezifischen Antigenen beim Schwein wurden die Lymphozyten von 30 nicht verwandten Schweinen mit 21 Antilymphozytenseren getestet. Diese Seren wurden vorher mit Thrombozyten aus 90 Liter stabilisiertem Blut von 60 verschiedenen Schweinen absorbiert. 60 % der Tiere waren männlich. Die Antilymphozytenseren wurden zweimal mit dem Sediment des Thrombozytenpools im Verhältnis ein Teil Thrombozyten und 4 Teile Serum absorbiert.

Die Lymphozyten wurden in nicht getrennten und in B- und T- Zellpopulationen getrennt mit den absorbierten Immunsereen untersucht. Außerdem wurden die Seren in Verdünnungen von 1/1 bis 1/16 eingesetzt, wodurch der Titer der B- Lymphozyten spezifischen Antikörper festgestellt wurde. Ebenso konnten die Titer der SLA- Antikörper ermittelt werden. Die SIA- Titer gingen bei einzelnen Seren bis zur Verdünnung 1/2034, während die B- Lymphozyten spezifischen Antikörpertiter nicht über 1/16 hinausgingen.

Von den 21 eingesetzten absorbierten Immunseren zeigten drei Seren Reaktionen, die auf B- Zellspezifität hinwiesen. Die übrigen 18 Seren enthielten noch teilweise hochtitrige SLA- Antikörper und somit keine erkennbare B- Lymphozyten spezifischen Reaktionen. Demnach war die eingesetzte Thrombozytenzahl zur Absorption dieser Immunseren nicht ausreichend.

Im zweiten Vorversuch wurden 7 weitere Antilymphozytenserum eingesetzt, die durch gezielte Immunisierungen von SLA- identischen Wurfgeschwistern und Tieren gewonnen wurden, die in ihren SLA- Faktoren gleich waren. Diese Seren wiesen Reaktionen auf, die auf B- Zellspezifität hindeuteten. Die 7 neuen, unabsorbierten Immunseren wurden zusammen mit den drei absorbierten Seren vom ersten Vorversuch mit Lymphozyten aus Lymphknoten beziehungsweise Blut von 62 nicht verwandten Schweinen auf ihre B- Lymphozyten spezifischen Antikörper getestet.

Die Lymphozyten wurden nicht getrennt und in B- und T- Lymphozytenfraktionen getrennt eingesetzt.

Die Seren wurden von Titer 1/1 bis 1/16 verdünnt.

Die Trennung in B- und T- Lymphozyten wurde bei 29

Tieren in der Nylonwollensäule und bei 33 Tieren in antikörperbeschichteten Petrischalen vorgenommen. Die 10 Testseren zeigten neben B- Lymphozyten spezifischen auch SLA- Reaktionen. Die noch vorhandenen SLA- Reaktionen der Seren, die durch Immunisierung mit SLA- identischen Tieren gewonnen wurden, entstanden dadurch, daß bislang unbekannte SLA- Spezifitäten zur Antikörperbildung geführt hatten.

Es handelte sich dabei um die SLA- Faktoren SLA 8, SLA 11 und SLA 16, die im internationalen Vergleichstest in Paris 1979 bestätigt wurden.

Aus den 10 Seren des zweiten Vorversuchs wurden 9 Seren ausgewählt. Diese Isoimmunseren wurden mit einem frisch gewonnenen Thrombozytenpool aus 76 Liter Blut von 56 Schlachtschweinen mit 70 % männlichen Tieren absorbiert.

Die Absorption der Seren wurde zweimal mit dem Thrombozytensediment im Verhältnis ein Teil Thrombozyten und zwei Teile Serum durchgeführt.

Die aus der zweiten Thrombozytenabsorption gewonnenen 9 Seren wurden mit den Lymphozyten von 13 Schweinefamilien untersucht. Bei diesen Familien handelte es sich um 5 Eber und 13 Muttersauen mit 52 Nachkommen.

Es wurden nicht getrennte und in B- und T- Zellen getrennte Lymphozytenpopulationen mit den absorbierbaren Seren in einer Verdünnung von 1/1 bis 1/16 getestet. Zum Vergleich wurden die gleichen Seren, jedoch nicht absorbiert, eingesetzt. Zur Kontrolle wurde der Test doppelt ausgeführt.

Mit den für die Familienuntersuchungen ausgewählten Antilymphozytenseren, die aus der zweiten Thrombozytenabsorption stammten, wurden sechs B- Lymphozyten spezifische Antigene markiert, die vorläufig mit Mü- SB 1 bis Mü- SB 6 (München, Schwein- B- Lymphozyten- Antigen) bezeichnet wurden.

Antikörper zum Nachweis der Antigene Mü- SB 1 und Mü- SB 5 wurden jeweils in zwei verschiedenen Isoimmunseren unterschiedlicher Herkunft festgestellt. Die Unterscheidung der B- Lymphozyten spezifischen Antigene erfolgte auf Grund der Reaktionsmuster in der untersuchten Schweinepopulation des Lehr- und Versuchsgutes Oberschleißheim (Tabelle 3).

Die Unabhängigkeit der einzelnen B- Lymphozyten spezifischen Antigene wurde durch Absorptionen bestätigt.

Tabelle 3

Differenzierung von B- Lymphozyten spezifischen Antigenen

beim Schwein, Mü- SB 1 - Mü- SB 5

Familie 1 - 2

		Mü- SB 1	Mü- SB 2	Mü- SB 3	Mü- SB 4	Mü- SB 5
Fam. 1	V					
	M					
	N					
	N					
	N					
	N					
	N					
	M					
	N					
	N					
	N					
	N					
Fam. 2	V					
	M					
	N					
	N					
	M					
	N					
	N					
	N					
	M					
	N					
	N					
	N					

V = Vattertier
M = Muttertier

N = Nachkomme
Fam. = Familie

Familie 3 - 5

		Mu- SB 1	Mu- SB 2	Mu- SB 3	Mu- SB 4	Mu- SB 5
Fam. 3	V					
	M					
	N					
	N					
	N					
	N					
	N					
	N					
	M					
	N					
	N					
	N					
	N					
	M					
	N					
Fam. 4	V					
	M					
	N					
	N					
	N					
	N					
	N					
	M					
	N					
	N					
	N					
	N					
Fam. 5	V					
	M					
	N					
	N					
	N					
	M					

Die Seren zum Nachweis der Lymphozytenantigene Mü- SB 1, Mü- SB 2 und Mü- SB 3 waren durch Absorptionen nicht aufspaltbar. Sie können somit als monovalente Testseren angesehen werden.

Das zweite Antilymphozytenserum zum Nachweis von Mü- SB 1 enthält zusätzlich eine Antikörperpopulation, die ein weiteres B- Lymphozyten spezifisches Antigen markiert, das als Mü- SB 6 bezeichnet wurde. Hinweise auf die Eigenständigkeit dieses Antigens haben sich im Absorptionsversuch ergeben.

Eine Darstellung seines Reaktionsmusters im Vergleich zu den Mustern von Mü- SB 1 bis Mü- SB 5 war nicht möglich, da die zuvor untersuchten Schweine zu einer weiteren Differenzierung ihrer Lymphozytenantigene nicht mehr zur Verfügung standen.

Die beiden Antilymphozytenserum, die die B- Lymphozytenantigene Mü- SB 4 beziehungsweise Mü- SB 5 erfassen, unterscheiden sich in ihrer Spezifität nach Reaktionsmuster und Absorptionsergebnis von den B- Lymphozyten spezifischen Antiseren, die die Antigene Mü- SB 1, Mü- SB 2, Mü- SB 3 und Mü- SB 6 markieren.

Die mit diesen beiden Seren nachweisbaren Lymphozytenantigene zeigten im Vergleich zu den anderen Lymphozytenantigenen in der untersuchten Tierpopulation eine verhältnismäßig hohe Phänotypfrequenz.

4.3. Vererbung von B- Lymphozyten spezifischen Antigenen beim Schwein

Der Erbgang der B- Lymphozyten spezifischen Antigene wurde an vollständigen Schweinefamilien untersucht.

Es wurden 13 Familien mit 5 Ebern und 13 Muttertieren mit 52 Nachkommen untersucht.

Auf Grund der vorliegenden Ergebnisse handelt es sich bei den B- Lymphozyten spezifischen Antigenen um genetisch determinierte Merkmale (Tabelle 3), die wie die anderen Blutgruppenantigene beim Schwein kodominant und autosomal vererbt werden.

Aus den Familienuntersuchungen geht weiterhin hervor, daß die mit B- Lymphozyten spezifischen Antisera markierten Antigene von mindestens einem Locus kontrolliert werden.

5. Diskussion

5.1. Besprechung der Methodik

Zur serologischen Markierung B- Lymphozyten spezifischer Antigene beim Schwein mußten für die Untersuchungen in B- und T- Lymphozyten getrennte Zellen zur Verfügung stehen. Um B- und T- Lymphozyten in ausreichenden Mengen, in hoher Anreicherung und in kurzer Zeit zu erhalten, wurden drei Methoden untersucht.

Die Spontanrosettenbildung mit Schafererythrozyten, die Trennung in der Nylonwollensäule und die Fraktionierung von B- und T- Lymphozyten in antikörperbeschichteten Petrischalen wurden auf die gestellten Anforderungen geprüft.

Bei der Spontanrosettierung von Schweinelymphozyten mit Schafererythrozyten lagen die Durchschnittswerte der rosettierten Zellen bei 35,3 % mit einer Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von 95 %. Diese Werte konnten mit den Ergebnissen von ESCAJADILLO und BINNS (1975) mit 31,5 % Erythrozytenrosetten, SHIMIZU et al. (1975) mit 36,9 %, MAYR und SCHLEGER (1978) mit 31,1 %, REYERO et al. (1977) mit $38 \% \pm 8,4$ und PAW-

IAS (1979) mit 40 % Spontanrosetten verglichen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden durchschnittlich 14 % B- Lymphozyten gefunden, die sich bei der Spontanrosettierung in der Interphase befinden. Dieser Wert von 14 % stand in guter Übereinstimmung mit dem von TIZARD (1977) beschriebenen B- Lymphozytenanteil von 12 %. REYERO et al. (1977) erhielt 23,8 % B- Lymphozyten bei der Spontanrosettierung mit einer Abweichung von $\pm 10,2$.

Mit Hilfe dieser Methode konnten aus 15 Milliliter stabilisiertem Schweineblut eine für den Mikrozytotoxizitätstest ausreichende Menge von angereicherten B- und T- Lymphozyten gewonnen werden.

Die in dieser Methode notwendige Hämolyse der Erythrozytenrosetten führte zu einer erheblichen Schädigung der T- Lymphozyten. Dies wirkte sich nachteilig auf die Beurteilung der Reaktionsstärken im mikrozytotoxischen Test aus. Ebenso verursachte die unterschiedliche Spontanrosettenbildung der verschiedenen Schafe eine unzureichende Zelltrennung (FINK, 1977; CICHON, 1979) und damit eine für den Testansatz zu geringe Ausbeute an getrennten T- und B- Lymphozyten.

Die Methode der Spontanrosettierung stellt ein zeit- und materialaufwendiges Verfahren dar. Sie ist schon

deshalb nicht standardisierbar, weil Erythrozyten verschiedener Schafe unterschiedliche Fähigkeiten zur Spontanrosettierung aufweisen.

Die Trennung von B- und T- Lymphozyten durch Spontanrosettenbildung mit Schaferythrozyten erweist sich dann als ungeeignet, wenn zur Beurteilung B- Lymphozyten spezifischer Reaktionen T- Lymphozyten als Kontrolle dienen sollen.

Bei der Fraktionierung von B- und T- Lymphozyten in der Nylonwollensäule wurden bei den hier beschriebenen Untersuchungen von den eingegebenen Lymphozyten durchschnittlich 52 % wiedergewonnen. Mit $54 \% \pm 10$ erhielt WERNER et al. (1977) ähnliche Werte. Die Lymphozytenausbeute schwankte bei VAIMAN et al. (1975) zwischen 40 - 80 %. Die Zellverluste erklärten sich damit, daß viele Lymphozyten irreversibel an der Nylonwolle haften.

Mit durchschnittlich 28,6 % B- Lymphozyten und 65,1 % T- Lymphozyten waren die Werte der vorliegenden Arbeit mit denen von WERNER et al. (1977), der 30 % B- Lymphozyten und 60 % T- Lymphozyten erhielt, vergleichbar.

Der Prozentsatz an vitalen B- Lymphozyten lag wie bei

VAIMAN et al. (1975) im Bereich von 85 %.

Die Zellfraktionierung in der Nylonwollensäule stellt ein unkompliziertes Verfahren dar, daß wenig Material und kürzere Zeit als die Spontanrosettierung beansprucht. Dabei war eine zuverlässige und ausreichende Zellanreicherung gewährleistet. Bei dieser Nylonwollefraktionierung haben sich die oft bis zu 15 % geschädigten B- Zellen als Nachteil erwiesen.

Entscheidend für eine gute Trennung in B- und T- Lymphozyten und eine reiche Ausbeute an Zellen, war der Einsatz von Nylonwolle im richtigen Mengenverhältnis zu den eingegebenen Lymphozyten. Trotzdem ließen sich Verluste an B- Lymphozyten nicht vermeiden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Trennung in der Nylonwollensäule so modifiziert, daß die Nylonwolle auf ein Mindestmaß von 0,1 Gramm reduziert werden konnte. Dennoch betrug die optimale Lymphozytenzahl zum Beschicken der Nylonwollensäule immer noch 10×10^6 Zellen, zu deren Isolierung 15 Milliliter Blut erforderlich waren. Blutentnahmen dieser Größenordnung können für junge Ferkel eine Belastung darstellen.

Die Trennung von B- und T- Lymphozyten in antikör-

perbeschichteten Plastikpetrischalen hat den großen Vorteil, daß aus viel geringeren Blutmengen eine ausreichende Anzahl von getrennten Lymphozyten gewonnen werden kann.

Die Beschichtung der Schalen mit Anti- Ig verdünnt mit IgG im Verhältnis 1 : 10 erbrachte eine durchschnittliche Lymphozytenausbeute von 65,7 %. Der durchschnittliche Prozentsatz an T- Lymphozyten mit 30,6 % und B- Lymphozyten mit 34,9 % nach Petrischalentrennung lag im selben Bereich wie nach Spontanrosettierung und Nylonwolletrennung.

Nach WYSOCKI und SATO (1978) garantiert die Trennung in antikörperbeschichteten Petrischalen mit 97 - 100 % eine sehr hohe Anreicherung an B- und T- Lymphozyten. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit auf Grund selbst schwacher B- Lymphozyten spezifischer Reaktionen bestätigt werden.

Die Fraktionierung von Lymphozyten in antikörperbeschichteten Petrischalen stellt eine einfache, zeitsparende und zuverlässige Methode der Wahl zur Gewinnung von hoch angereicherten B- und T- Zellpopulationen dar. Ein weiterer entscheidender Vorteil dieser Methode ist die zellschonende Trennung. In

den durchgeführten serologischen Untersuchungen konnten im Farbausschlußtest bei B- und T- Lymphozyten keine Zellschädigungen festgestellt werden.

Auf diese Weise gewonnene Lymphozyten eigneten sich in hervorragendem Maße selbst zum Nachweis sehr schwacher mitotoxischer Antigen- Antikörper- Reaktionen.

Die Zellverluste, die in allen drei Methoden eintraten, waren rein technisch bedingt. In den verschiedenen Stadien der Trennungsvorgänge kam es zu einem unvermeidlichen Zellverlust. Der Adhärenz der B- Lymphozyten an Glasoberflächen wurde zwar damit entgegengewirkt, daß Polystyrenreagenzgläser für die B-Zellpopulation eingesetzt wurden. Dennoch entstanden Verluste an B- Lymphozyten beim Pipettieren mit Glaspasteurpipetten. Durch Silikonisieren der Pipetten kann der Zellverlust vermindert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch auf eine Silikonisierung der Glasgeräte verzichtet werden, da genügend Zellen zur Verfügung standen.

Die Lymphozytenfraktionen wurden mit Antilymphozytenseren im Mikrozytotoxizitätstest untersucht.

Zur Sicherstellung, daß alle, auch schwache B- Lymphozyten spezifischen Reaktionen erfaßt werden konnten, wurden die Inkubationszeiten der Lymphozyten mit dem Antiserum auf eine Stunde verlängert. Nach Zugabe von Komplement wurde die Bebrütungszeit auf zwei Stunden heraufgesetzt.

Die schonende Zelltrennung in der Petrischale erlaubte eine verlängerte Inkubationszeit, ohne daß unspezifische Zellschädigungen beobachtet wurden.

Die Spezifität der zytotoxischen Reaktionen konnte durch den Einbau mehrfacher Kontrollen gesichert werden. Grundsätzlich wurde der Test in doppelter Ausführung angesetzt und Kochsalzkontrollen mitgeführt.

Die Spezifität der B- Lymphozytenreaktionen wurde durch den gleichzeitigen Einsatz von nicht getrennten Lymphozyten und T- Lymphozyten bewiesen.

Als weitere Spezifitätskontrolle dienten in Verdünnungsreihen geführte Antilymphozytenserum.

Fehlerquellen beim Testansatz und bei der Beurteilung der Reaktionen konnten durch diese mehrfachen Kontrollen ausgeschaltet werden.

5.2. Besprechung der immungenetischen Ergebnisse

Ein Nachweis von B- Lymphozyten spezifischen Antigenen gelang zunächst in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) (AMOS und BACH, 1968).

VAN ROOD et al. (1975) entwickelten dann beim Menschen eine Methode zum serologischen Nachweis von B- Lymphozyten spezifischen Antigenen mit spezifischen Antisera.

Diese Methode setzte auch VAIMAN et al. (1975) zur Markierung von Ia- Antigenen an B- Zellen des Schweines ein, um Aufschlüsse über die Loci zu erhalten, die diese Merkmale und die der gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) genetisch kontrollieren.

Antilymphozytensera, die gegen B- Lymphozyten spezifische Antigene gerichtet sind, zeigen bei Lymphozyten charakteristisch schwache Reaktionen mit 10 - 30 % zytotoxisch geschädigter Zellen (VAN ROOD et al., 1975; ALBERT et al., 1977).

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Isoimmunsere vom Schwein in Vorversuchen auf mögliche B-Zellspezifitäten geprüft. Diese Vorversuche wurden an nichtgetrennten und in B- und T- Lymphozyten getrennten Zellpopulationen durchgeführt.

Zur Abgrenzung B- Lymphozyten spezifischer Reaktionen gegen schwache SLA- Reaktionen, wurden angereicherte B- Lymphozyten im Vergleich zu nicht getrennten Lymphozyten geprüft.

Für die Familienuntersuchungen wurden aus den Isoimmunseren neun Seren herausgewählt, die vermehrt durch B- Lymphozyten spezifische Reaktionen aufgefallen waren.

Sie wurden mit einem Thrombozytenpool absorbiert, um vorhandene SLA- Antikörper zu entfernen.

Die absorbierten Seren wurden in Verdünnungsreihen im Vergleich zu ihren korrespondierenden, nicht absorbierten Seren eingesetzt.

Damit wurden 13 Schweinefamilien mit ihren Nachkommen auf ihre B- Lymphozyten spezifischen Antigene und deren Vererbung getestet.

Die B- Lymphozyten spezifischen Antiseren wurden mit nicht getrennten und mit B- und T- Lymphozyten geprüft. Bei positiven Merkmalsträgern wies die B- Lymphozytenpopulation einen bestimmten Prozentsatz an geschädigten Lymphozyten auf.

Manchmal zeigten auch die T- Lymphozyten, aber nicht die ungetrennte Lymphozytenpopulation eine Zytolyse, die jedoch schwächer ausfiel, als die der B- Lymphozyten. Diese Zytolyse der T- Lymphozyten konnte so erklärt werden, daß bedingt durch die Trennmethode bereits Zellschädigungen in der T- Zellfraktion vorlagen, wie dies bei der Spontanrosettierung manchmal der Fall war.

Eine weitere Erklärung war das Vorhandensein von B- Lymphozyten in der T- Lymphozytenfraktion. Bei zu hoher Zelleingabe sowohl bei der Nylonwollentrennung, als auch bei der Trennung in antikörperbeschichteten Petrischalen, konnten sich nicht alle B- Lymphozyten an der Nylonwolle beziehungsweise auf der mit Anti-Ig beschichteten Petrischale anlagern und wurden somit in die T- Lymphozytenfraktion gespült.

Eine weitere Möglichkeit der T- Lymphozytenreaktion besteht nach GERBASE-DELIMA et al. (1980) darin, daß auf T- Zellen Ia- Antigene vorkommen können, die mit B- Lymphozyten spezifischen Antiseren Reaktionen eingehen.

Durch die mehrfach eingebauten Kontrollen im Testansatz konnten diese zusätzlichen Reaktionen von echten B- Lymphozyten spezifischen Reaktionen unterschieden werden.

Die serologische Typisierung von B- Lymphozyten spezifischen Antigenen ist problematisch, da die B- Lymphozyten spezifischen Reaktionen mit einem Prozentsatz von 10 - 30 % geschädigter Zellen allgemein schwach sind. Zytolysen bis zu 60 % geschädigter Zellen treten auf, sind aber nicht die Regel. Die schwachen B- Lymphozyten spezifischen Reaktionen können besser erkannt werden, indem nicht getrennte Lymphozyten und T- Zellen im Vergleich zu den B- Lymphozyten zum Einsatz gebracht und die Testseren in Titrationsreihen geführt werden.

Die Antilymphozytenseren weisen selbst innerhalb einer Familie sehr schwache neben starken B- Lymphozyten spezifischen Reaktionen auf. Es ist noch nicht geklärt, ob es sich hierbei um schwache beziehungsweise starke Merkmalsträger handelte, oder ob Heterozygotie beziehungsweise Homozygotie vorlag. Durch gezielte Paarungen können diese Reaktionen geklärt werden.

Entscheidend für die Typisierung von B- Lymphozytenantigenen ist der Einsatz von Immunsereen, die zuvor ausreichend mit Thrombozyten absorbiert worden sind, um eventuelle SLA- Antikörper zu entfernen. Seltene SLA- Faktoren können nicht immer vollständig absor-

biert werden, da Merkmalsträger dieser SLA-Spezifität selten auftreten oder Thrombozyten dieser Merkmalsträger im Thrombozytenpool für die Absorption nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Dadurch kann es zur Überdeckung von B- Lymphozyten spezifischen Zytolysen durch SLA- Antikörperreaktionen kommen, die die Markierung von B- Lymphozyten spezifischen Antigenen erschwert.

Einige der eingesetzten Isoimmunseren zeigten bei den untersuchten Schweinefamilien eine Reaktionsfrequenz über 95 %. Die Frage, ob es sich dabei um polyvalente B- Lymphozyten spezifische Antiseren handelte, oder ob der Genpool der untersuchten Population nur zu homogen war, konnte nicht beantwortet werden.

Schwierigkeiten bei der Absorption von B- Lymphozyten spezifischen Antiseren zum Nachweis ihrer Poly- beziehungsweise Monovalenz waren dadurch bedingt, daß ausreichende Mengen von B- Lymphozyten typisierter Tiere nicht immer zur Verfügung standen.

Absorptionen, die mit B- Lymphozyten durchgeführt wurden, wiesen nur in einigen Schweinefamilien Erfolge

auf, wobei zuvor stark positive B- Lymphozyten spezifische Reaktionen abgeschwächt und schwach positive B- Lymphozyten spezifische Reaktionen negativ ausfielen. Dies diente als Hinweis, daß für B- Lymphozyten spezifische Absorptionen die B- Zellen starker oder homozygoter Merkmalsträger eingesetzt oder hochtitrige Antilymphozytenseren mit einer wesentlich größeren Anzahl zuvor typisierter B- Lymphozyten absorbiert werden müssen.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden zwei Isoimmunseren nicht ausgewertet, da sie durch Absorptionen nicht fraktionierbar waren und mit über 95 % der untersuchten Tiere reagierten.

Diese Seren besaßen hohe B- Lymphozyten spezifische Antikörpertiter. Eines dieser Seren zeigte im internationalen SLA- Vergleichstest 1979 Ia- Spezifität. Aus den zuvor genannten Gründen konnte diese Ia- Spezifität in der vorliegenden Arbeit nicht identifiziert werden.

Die übrigen sieben Antilymphozytenseren ließen sich auf Grund ihrer Reaktionsmuster differenzieren.

Drei dieser Seren zeigten deutlich unterschiedliche Reaktionsmuster zur Markierung der B- Lymphozyten spezifischen Antigene MU- SB 1, MU- SB 2 und MU- SB 3.

Gezielte Absorptionen führten zu keiner Fraktionierung dieser Antilymphozytenserum. Sie müssen daher als monovalente Testserum angesehen werden.

Zur Typisierung des Lymphozytenantigens Mü- SB 1 standen zwei Isoimmunserum zur Verfügung, die durch Immunisierung mit Lymphozyten nicht verwandter Schweine gewonnen wurden. Eines dieser Serum erwies sich als monovalent, das andere Serum zeigte neben den Mü- SB 1 spezifischen Reaktionen weitere Zytolysen, die durch gezielte Absorptionen eine zweite Antikörperpopulation in diesem Immunserum bestätigten. Diese Spezifität wurde als Mü- SB 6 bezeichnet. Das Reaktionsmuster von Mü- SB 6 konnte in Tabelle 3 nicht dargestellt werden, da die zuvor typisierten Schweinefamilien einer weiteren vergleichenden Antigenanalyse nicht mehr zur Verfügung standen. Die Aufspaltung der Antikörperspezifität Anti- Mü- SB 1 und Anti- Mü- SB 6 konnte in zwei Schweinefamilien mit 12 Nachkommen gesichert werden.

Die Immunserum zum Nachweis von Mü- SB 4 und Mü- SB 5 reagierten in einem verhältnismäßig hohen Prozentsatz der Tiere in der untersuchten Schweinepopulation. Die Frequenz für Anti- Mü- SB 4 lag bei 75 %,

für Anti- MU SB 5 bei 84 %. Die hohe Reaktionshäufigkeit dieser Seren gab Veranlassung zur Überprüfung ihrer Mono- beziehungsweise Polyvalenz.

Absorptionsversuche dieser Seren lassen es nicht ausgeschlossen erscheinen, daß innerhalb dieser B- Lymphozyten spezifischen Antigene lineare Untergruppenbeziehungen vorliegen.

Obwohl weltweit an der serologischen Differenzierung und der Markierung B- Lymphozyten spezifischer Antigene in der gemischten Lymphozytenkultur gearbeitet wird, liegen auf diesem Gebiet bis jetzt noch keine internationalen Vergleichsuntersuchungen vor.

Die B- Lymphozyten spezifischen Antigene sind von den serologisch nachweisbaren SLA- Antigenen abgrenzbar. Die Zuordnung der B- Lymphozyten spezifischen Antigene zu einem bestimmten Locus ist im Augenblick noch nicht möglich.

Das Interesse an den B- Lymphozyten spezifischen Antigenen besteht in ihrer Funktion als Marker für Immunantwort und Resistenz.

Die Erforschung der B- Lymphozyten spezifischen Antigene beim Schwein schafft Grundlagen zur Erkennung der Zusammenhänge von Krankheitsdispositionen und ihrer serologischen Markierbarkeit.

6. Zusammenfassung

Bei der Erforschung des Histokompatibilitätssystems gelang es beim Schwein, B- Lymphozyten spezifische Antigene serologisch zu markieren.

Voraussetzung für diesen Nachweis war die Gewinnung von hoch angereicherten B- Lymphozyten.

Als Methode der Wahl hat sich die Trennung von B- und T- Lymphozyten in antikörperbeschichteten Plastikpetrischalen erwiesen. Mit diesem Verfahren lassen sich aus kleinen Blutmengen eine ausreichende Anzahl vitaler B- und T- Lymphozyten isolieren.

In den serologischen Untersuchungen wurden sowohl nicht getrennte, als auch hoch angereicherte B- und T- Lymphozyten eingesetzt. Die T- Lymphozyten dienten als negative Kontrolle für B- Lymphozyten spezifische Reaktionen.

Zum Nachweis von B- Lymphozyten spezifischen Antigenen wurden absorbierte Isoimmunseren eingesetzt. Durch Absorption mit Thrombozyten wurden SLA- Antikörper entfernt, die gegen alle kernhaltigen Zellen gerichtet sind.

Die serologischen Untersuchungen wurden im Mikrozototxizitätstest durchgeführt.

Mit ausgewählten Testseren gelang die Differenzierung von sechs verschiedenen B- Lymphozyten spezifischen Antigenen beim Schwein. Diese Antigene wurden mit Mü- SB 1, Mü- SB 2, Mü- SB 3, Mü- SB 4, Mü- SB 5 und Mü- SB 6 bezeichnet.

Die Untersuchungen an Schweinefamilien ergab, daß die markierten Antigene einem autosomalen, kodominanten Erbgang folgen.

Dieser Beitrag über die B- Lymphozyten spezifischen Antigene beim Schwein schafft eine weitere Grundlage bei der Erforschung seines Histokompatibilitätssystems und eröffnet Möglichkeiten zur Erforschung von Zusammenhängen zwischen B- Lymphozyten spezifischen Antigenen und Krankheitsdispositionen und deren serologischer Markierbarkeit.

7. Summary

In the study of the histocompatibility complex of the pig it was possible to identify serologically B- lymphocyte- specific antigens.

Highly enriched B- and T- lymphocytes were essential for this study. The separation of B- and T- lymphocytes in polysterene dishes proved to be the most reliable and convenient method to obtain high yields of vital B- and T- lymphocytes from small quantities of blood.

Unseparated as well as highly enriched B- and T- lymphocytes were simultaneously employed for the serological typing. T- lymphocytes served as negative controls for the B- lymphocyte- specific reactions.

Pre-absorptions of isoimmune anti- lymphocyte reagents with pooled platelets removed SLA- antibodies directed against antigens present on all nucleated cells, thus rendering these sera suitable for the typing of B- lymphocyte- specific antigens.

Serological typing was performed using the micro-cytotoxicity test.

Selected reagents employed in this study allowed to identify six different B- cell- specific antigens on lymphocytes of the pig.

These antigens were designated Mü- SB 1, Mü- SB 2, Mü- SB 3, Mü- SB 4, Mü- SB 5 and Mü- SB 6.

Family studies confirmed that these antigens are genetically determined, and follow an autosomal and codominant trait of inheritance.

This study on B- lymphocyte- specific antigens is a contribution to research on the Major Histocompatibility Complex (MHC) of the pig. It also opens up possibilities for studies on associations between B- lymphocyte- specific antigens and susceptibility to diseases.

8. Literaturverzeichnis:

Albert, E.D. (1973):

Die genetischen Systeme der menschlichen
Histokompatibilität: Das HLA- System.

Blut 2, 73-80

Albert, E.D., A. Andreas, A. McNicholas, S. Scholz
und B. Kuntz (1977):

B- and T- cell- specific alloantigens in
man.

Scand. J. Immunol., 6, 427-430

Albert, E.D., D.B. Amos, W.F. Bodmer, B. Ceppellini,
J. Dausset, F. Kissmeyer-Nielsen, R. Payne,
J.J. van Rood, P.I. Terasaki, Z. Trnka und
R.L. Walford (1978):

Nomenclature for factors of the HLA- system,
1977.

Bull. W.H.O. 56, 461-465

Albert, E.D. (1979):

Krankheitsdispositionen und HLA.

Persönliche Mitteilungen

Albrechtsen, D., B.G. Solheim und E. Thorsby (1978):

Relationship of HLA- D associated B lymphocyte (Ia- like) antigens in the cell membrane.

Tissue Antigens, 11, 372-383

Amos, D.B. und F.H. Bach (1968):

Phenotypic expression of the major histocompatibility locus in man (HLA- A) leucocyte antigens and mixed leucocyte culture reactivity.

J. exp. Med. 128 (4), 623-637

Arnoux, B., P. Chardon, C. Renard, M. Vaiman und J. Haag (1974):

Isolement de deux antigenes d'histocompatibilité SLA du porc et caractérisation biochimique.

C. R. Acad. Sc., Paris, 279, 1817

Bach, F. und K. Hirschhorn (1964):

Lymphocyte interaction: A potential histocompatibility test in vitro.

Science 143, 813-814

Bain, B., L. Vas und L. Lowenstein (1964):

The development of large immature mono-
nuclear cells in mixed leucocyte cultures.
Blood 23, 108-116

Balner, H., W. van Vreeswijk und J.H. Roger (1976):

Ia- like antigens of rhesus monkeys:
current state of serology and genetics.
Transplant. Rev., 30, 3-17

Bertrams, J. (1976):

HLA- Antigene und Krankheitsempfänglich-
keit.
Dtsch. med. Wschr. 101, 178-184

Binns, R., M. Vaiman, H. und S. Davies und D. Symons
(1979):

Characterisation of pig lymphocyte subpopu-
lations by adherence to nylon wool.
Int. Archs. Allergy appl. Immunol., 58, 128-134

Bøyum, A. (1964):

Separation of white blood cells.

Nature, 21, 793-794

Catt, K. und G.W. Treagar (1967):

Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes.

Science, 158, 1570-1572

Ceppellini, R.E., E.S. Curtioni, P.L. Mattiuz, V.

Miggiano, G. Scudeller und A. Serra (1967):

Genetics of leucocyte antigens.

A family study of segregation and linkage.

Histocompatibility Testing, 149-185

Munksgaard, Copenhagen

Chardon, P., M. Vaiman, C. Renard und B. Arnoux (1978):

Pig histocompatibility antigens and β_2 -microglobulin.

Transplantation, 26 (2), 107-112

Cichon, H.U. (1979):

Serologisch nachweisbare B- Lymphozyten
spezifische Antigene beim Rind.
Inaugural-Dissertation, Fachbereich Tier-
medizin der Universität München

Colombani, J. (1978):

Immune region associated (Ia) murine anti-
gens and their human equivalents.
Transplantation and clinical immunology, IX,
Excerpta Medica, Amsterdam, 83-89

Cresswell, P.S. und S.S. Geier (1975):

Antisera to human B- lymphocyte membrane
glycoproteins block stimulation in mixed
lymphocyte culture.
Nature, 257, 147-149

Dausset, J. (1958):

Iso-leuco-anticorps.
Acta haemat. (Basel), 20, 156-166

David, C.S. (1979):

Role of Ia antigens in immune response.

Transplant. Proc., 11, 677-682

Eisen, S.A., H.J. Wedner und C.W. Parker (1972):

Isolation of pure peripheral blood T- lymphocytes using nylon wool columns.

Immunol. Comm., 1, 571-577

Escajadillo, C. und R.M. Binns (1975):

Rosette formation with sheep erythrocytes - a possible T- cell marker in the pig.

Int. Archs. Allergy appl. Immun., 48, 261-275

Fink, U. (1977):

Persönliche Mitteilung

Hämatologisches Forschungslabor der I. Med.

Klinik re. d. Isar d. Techn. Universität

München

Fröland, S.S. und J.B. Natvig (1973):

Identification of three different human lymphocyte populations by surface markers.

Transplant. Review, 16, 114-162

Fruchtmann, R., G. Uhlenbruck, D.O. Schmid und

S. Cwik (1977):

Zur Charakterisierung von T- und B- Lymphozyten beim Rind.

Zbl. Vet. Med., B. 24, 486-496

Gerbase-Delima, M., M.H. Kraemer, N.F. Novo, E.R.

Paiva und N.F. Mendes (1980):

Expression of HLA- DR antigens on T lymphocytes.

Tissue Antigens, 15, 257-266

Goldmann, S.F., K.Krumbacher, H. Schnappauf und H.D.

Flad (1975):

Definition of MLC specificities in the dog.

Transplant. Proc., 7, 389-393

Gorer, P.A. (1938):

Antigenic basis of tumor transplantation.

J. Path. Bact., 47, 231

Goulmy, E., B.A. Bradley, A. van Leeuwen, Q. Lans-
bergen, A. Munro, A. Termijtelen und J.J.
van Rood (1977):

The immunogenicity in women of male cells
bearing H-Y and HLA- A2.

Tissue Antigens, 10, 248

Greaves, M.F. und G. Brown (1974):

Purification of human T and B lymphocytes.

J. Immunol., 112, 420-423

Greenberg, A.H., L. Hudson, L. Shen und J.M. Roitt
(1973):

Antibody-dependent cell-mediated cytotoxic-
ity due to a "Null" lymphoid cell.

Nature New Biology, 242, (28), 111-113

Grewal, A., B. Rouse und L. Babiuk (1976):

Erythrocyte rosettes - a marker for bovine
T cells.

Canad. J. compar. Med., 40, 298-305

Gürtler, L.G. und H. Cleve (1978):

Ulex europeus lectin - a lymphocyte surface
label for human B- cells.

Proc. 25th Colloquium Protides of the biological
Fluids, B. 4, 715-723

Hallberg, T. (1975):

Human lymphocyte subpopulations.

Acta pathol. microbiol. scand. Sect. C

Suppl. No. 250

Hämmerling, G.J. (1976):

Tissue distribution of Ia antigens and
their expression on lymphocyte subpopulations.

Transplant. Rev., 30, 64-82

Hammarström, S., U. Hellström, P. Perlmann und M.

Dillner (1973):

A new surface marker on T lymphocytes of
human peripheral blood.

J. exp. Med., 138, 1270-1275

Hruban, V., M. Simon und J. Hradecky (1974):

Histocompatibility studies in pigs from
outbred and semi-inbred families.

Anim. Blood Grps. biochem. Genet., 2, 171-176

Hruban, V., M. Simon, J. Hradecky und J. Pazdera
(1977):

Serologically defined specificities of the
pig main histocompatibility complex SLA.

Anim. Blood Grps. biochem. Genet., 8, 85-92

Hruban, V., J. Hradecky, J. Pazdera, M. Simon und
L. Veselsky (1978):

SLB, a new alloantigenic system of the pig.

Journal of Immunogenetics, 2, 173-178

Jäger, G., H. Rodt und D. Huhn (1977):

Polyacrylsäurekügelchen als Nachweis von
B- Lymphozyten

Klin. Wschr., 55, 45-46

Jilek, F. und L. Veselsky (1972):

The occurrence of lymphocyte antigens on
boar spermatozoa.

J. Reprod. Fert., 31, 295-298

Johansen, K.S., T.S. Johansen und D.W. Talmage (1974):

T cell rosette formation in primates, pigs
and guinea pigs. The influence of immun-
suppressive agents.

J. Allergy Clin. Immunol., 54 (2), 86-93

Johnson, A.H., F.E. Ward und D.B. Amos (1977):

B- Lymphocyte alloantigens.

Scand. J. Immunol., 6, 403-408

Jondal, M. und G. Klein (1973):

Surface markers on human B and T lympho-
cytes.

II. Presence of EBV virus receptors on B
lymphocytes.

J. exp. Med., 138, 1365-1378

Jondal, M. (1974):

Surface markers on human B and T lymphocytes.

III. A marker for lymphoid adherence.

Scand. J. Immunol., 3, 269

Julius, M.H., E. Simpson und L.A. Herzenberg (1973):

A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes.

Europ. J. Immunol., 3, 645-649

Kissmeyer-Nielsen, F. und K.E. Kjerbye (1967):

Lymphocytotoxic microtechnique purification of lymphocytes by flotation.

Histocompatibility Testing, 381-383

Leight, G., D. Sachs und S. Rosenberg (1977):

Transplantation in miniatur swine.

II. In vitro parameters of histocompatibility in MSLA homozygous minipigs.

Transplantation, 23, 271-276

Lohrmann, H.P., L. Novikova und R.G. Graw (1974):

Stimulatory capacity of human T and B lymphocytes in the mixed lymphocyte culture.

Nature, 250, 144-146

Lunney, J. und S. Sachs (1978):

Transplantation in miniature swine.

IV. Chemical characterisation of MSLA Ia-like antigens.

J. Immunol., 120, 607-612

Mage, M.G., L.L. McHugh und T.L. Rothstein (1977):

Mouse lymphocytes with and without surface immunoglobulin: Preparative scale separation in polystyrene tissue culture dishes coated with specifically purified anti-immunoglobulin.

Journal of Immunological Methods, 15, 47-56

Mayr, B. und W. Schleger (1978):

Untersuchungen über Erythrozytenrosetten bildende periphere T- Zellen bei Rind, Schwein und Pferd.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 91, 437-439

Medawar, P.B. (1946):

Immunity to homologous grafted skin.

II. The relationship between the antigens
of blood and skin.

Brit. J. Exp. Path., 27, 15

Mempel, W. und H. Grosse-Wilde (1973):

MLC- Eigenschaften, ein eigenes Histokom-
patibilitätssystem.

Blut, 27, 369-375

Mitscherlich, E. (1977):

Grundlagen der Immunitätsbildung und der
Immunprophylaxe beim neugeborenen Kalb.

Tierärztl. Prax., 2, 45-57

Müller, J., G. Brun del Re, H. Buerki, H.U. Keller,

M.W. Hess und H. Cottier (1975):

Nonspecific acid esterase activity.

Criterion for differentiation of T and B
lymphocytes in mouse lymph nodes.

J. Immunol., 2, 270-272

Mukoyama, H., K. Ago, M. Kozaki, K. Tanaka und S.

Suzuki (1977):

Comparison and identification tests
for standard anti-lymphocyte sera of pigs.
Japanese Journal of Zootechnical Science,
48, 153-160

Muscoplat, C.C., D.W. Johnson, K.A. Pomeroy, J.M.

Olson, V.L. Larson, J.B. Stevens und K.D.

Sorensen (1974):

B- and T- lymphocytes in three types of
bovine lymphosarcoma.

Amer. J. Vet. Res., 35, 593-595

Newell, D.O., S. Roath und I.C. Smith (1976):

The scanning electron microscopy of normal
human peripheral blood lymphocytes.

Brit. J. Haematol., 32, 309-315

Ohshima, H., H. Mukoyama, K. Tanaka, S. Ikemoto und

S. Suzuki (1971):

Immunological studies on the leucocyte
type of pigs.

Journal of Agricultural Science, Tokio
Nogyo Daigaku, 80-90

Otto, F. und D.O. Schmid (1970):

Lymphozytenisolierung aus dem Blut des
Menschen und der Tiere.

Blut, 21, 118-122

Pawelec, G., H., S. Davies, J.D. Pearson, C.

Steele und G. Brous (1979):

Stimulation of lymphocyte proliferation
by non-lymphoid porcine tissue cells.

Tissue Antigens, 14, 367-378

Pawlas, S. (1979):

Untersuchungen zur Charakterisierung der
Lymphozytenpopulationen von Schwein und
Rind.

Inaugural-Dissertation, Fachbereich Tier-
medizin der Universität München

Reyero, C., J.G. Thalhammer, G. Reszler und W. Stöckl
(1978):

Development of peripheral B and T lympho-
cytes in piglets.

Z. Immun.-Forsch., 154, 409-415

van Rood, J.J., A. van Leeuwen, J.J. Keuning und
A. Blusse van Oud Albas (1975):

The serological recognition of the human
MLC determinants using a modified cytoto-
xicity technique.

Tissue Antigens, 5, 72-79

van Rood, J.J. (1977):

Immunologische HLA- Typisierung.

Ein Werkzeug zur Erfassung von Transplanta-
tionspartnern und Krankheitsdispositionen.

Klin. Wschr., 55, 1209-1215

Rouse, B.T. und L.A. Babiuk (1974):

Host defense mechanism against infectious
bovine rhinotracheitis virus. Isolation
and immunological activities of bovine T-
lymphocytes.

J. Immunol., 113, 1391-1398

Sachs, D., G. Leight, J. Cone, S. Schwarz, L. Stuart
und S. Rosenberg (1976):

Transplantation in miniature swine.

I. Fixation of the major histocompatibili-
ty complex.

Transplantation, 23 (6), 559-567

Scholle, H., W. Schlag und H. Rühl (1972):

Vergleichende Untersuchung verschiedener
Methoden zur Isolierung peripherer mensch-
licher Lymphozyten.

Blut, 24, 54-57

Schmid, D.O. und S. Cwik (1972):

On leucocyte serology in the pig and cattle.

13th Europ. Conf. Anim. Blood Grps., Wien

Seiler, F.R., H.H. Sedlacek, E.J. Kanzy und W. Lang
(1972):

Über die Brauchbarkeit immunologischer Nach-
weismethoden zur Differenzierung funktionell
verschiedener Lymphozyten: Spontanrosetten,
Komplementrezeptorrosetten und Immunglobu-
linrezeptoren.

Behring Institut Mitteilungen, 52, 26-72

Shevach, E.M. und B.D. Schwartz (1977):

Overview of the structure and function of
the major histocompatibility complex of
the guinea pig.

Fed. Proc., 36 (9), 2260-2263

Shimizu, M., I.C. Pan und W.R. Hess (1975):

T and B lymphocytes in porcine blood.

Am. J. Vet. Res., 37, 309-317

Takashima, I., C. Olson, D.M. Driscoll und L.E.

Baumgartner (1977):

B- lymphocytes and T- lymphocytes in three
types of bovine lymphosarcoma.

J. Natl. Cancer Inst., 59, 1205-1209

Tarr, M.J., R.G. Olsen, G.S. Krakowa, G.L. Cockerell

und A.A. Gabel (1977):

Erythrocyte rosette formation of equine
peripheral blood lymphocytes.

Am. J. Vet. Res., 38 (11), 1775-1779

Terasaki, P.I. und J. McClelland (1964):

Mikro-droplet assay of human serum cyto-
toxins.

Nature, 204, 998-1000

Thorsby, E. (1978):

Biological function of HLA.

Tissue Antigens, 11, 321-329

Tizard, I.R. (1977):

Veterinary Immunology

W.B. Saunders Company Philadelphia-Toronto

Uhlenbruck, G., P. Wernet und K. Schuhmacher (1973):

Specific T-cell marking by Melix pomatia
agglutinin after neuraminidase treatment.

Klin. Wochr., 51, 1210-1211

Unger, P., P. Kissmeyer-Nielsen und E. Thorsby (1971):

A disposable tray for micro-droplet tissue
typing.

Vox Sanguinis, 20, 286-287

Ussinger, W.R., M. Curie-Cohen und W.H. Stone (1977):

Lymphocyte defined loci in cattle.

Science, 196, 1017-1018

Vaiman, M., A. Arnoux, X. Filleul und P. Nizza
(1970 a):

Le système d'histocompatibilité SL-A du
porc: étude par la technique des culture
mixtes des leucocytes.

Comptes rendues hebdomadaires de l'Académie
des Sciences, 271, 1724-1726

Vaiman, M., C. Renard, P. Lafage, L. Ameteau und P.
Nizza (1970 b):

Evidence for a histocompatibility system
in swine (SL-A).

Transplantation, 10 (2), 155-164

Vaiman, M., J. Haag, A. Arnoux und P. Nizza (1973):

The histocompatibility complex in pig:
Possible recombination between the regions
governing MLR and serology respectively.

Tissue Antigens, 2, 204-211

Vaiman, M. (1974):

Le complexe d'histocopatibilité majeur
SL-A du porc.

First World Congress on Genetics Applied to
Livestock Production, Madrid, 1, 273

Vaiman, M., C. Renard, M. Ponceau, J. Lecointre und
P.A. Villiers (1975):

Alloantigènes sous la dépendance de la région
SL-A contrôlant la réaction lymphocytaire
mixte chez le porc.

C.R. Sc. Paris, 280 (D), 2809-2812

Vaiman, M., G. Hauptmann und C. Mayer (1978 a):

Influence of the major histocompatibility
complex in the pig (SLA) on serum haemoly-
tic complement levels.

Journal of Immunogenetics, 5, 59-65

Vaiman, M., M. Fellous, C. Wiels, C. Renard, J. Le-
cointre und F. Du Mesnil Du Buisson (1978 b):

Presence of SLA and Ia- like antigens on
boar spermatozoa.

J. Immunogenet., 5, 135-142

Vaiman, M. (1979):

The major histocompatibility complex SLA
of the pig.

Anim. Blood Grps. biochem. Genet., 10, 125-126

Valdimarsson, H., G. Agnarsdottir und P.J. Lachmann

(1975):

Measles virus receptor on human T lymphocytes.

Nature London, 255, 554-556

Vassar, P.S., E.M. Levy und D.E. Brooks (1976):

Studies on the electrophoretic separability of B and T lymphocytes.

Cellular Immunology, 21, 257-271

Vautherot, J. und H. Salmon (1977):

Adsorption élektive des érythrocytes de cobaye sur différentes sous-populations leucocytaires du cheval.

Bull. Acad. Vét. de France, 50, 293-302

Werner, C., P.T. Klouda, M.C. Corrêa, P. Vassalli

und M. Jeannet (1977):

Isolation of B and T lymphocytes by nylon fiber columns.

Tissue Antigens, 9, 227-229

White, D., B. Bradley, R. Calne und R. Binns (1973):

The relationship of the histocompatibility locus in the pig to allograft survival. Transplantation Proceedings, 5, 317-320

Wilson, A.B. und R.R.A. Coombs (1973):

Rosette formation by guinea pig thymocytes and rabbit erythrocytes - a possible T-cell marker.

Int. Arch. Allergy, 44, 544-552

Witting, C. und H. Harjans (1980):

Nachweis der unspezifischen Esterase - ein besserer T- Lymphozyten- Marker als der Spontanrosettentest?

Dtsch. Med. Wschr., 10, 348-349

Wysocki, L.J. und V.L. Sato (1978):

"Panning" for lymphocytes:

A method for cell selection.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2844-2845

Zeiller, K. und G. Pascher (1973):

Detection of T and B cell-specific hetero-
antigens on electrophoretically separated
lymphocytes of the mouse.

Eur. J. Immunol., 3, 614-618

Zinkernagel, R.M. und P.C. Doherty (1977):

Possible mechanisms of disease-suscepti-
bility association with major transplanta-
tion antigens.

HLA and disease, Munksgaard, Copenhagen,
256-268

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Dr. h.c. A. Mayr danke ich herzlich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Blutgruppen- und Resistenzforschung in München.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. D.O. Schmid für die Überlassung des Themas und die mir stets gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Dr. S. Cwik danke ich herzlich für seine wertvollen Ratschläge und seine bereitwillige Hilfe im Verlauf der Arbeit.

Den Mitarbeitern des Blutgruppeninstituts, insbesondere Frau Pfeffer und Frl. Gebhard, danke ich für ihren tatkräftigen Beistand.

Zu Dank verpflichtet bin ich Herrn Professor Dr. H. Kräußlich und Herrn Professor Dr. J. Meyer für die Bereitstellung von Schweinefamilien für die Blutgruppenuntersuchungen.

Herrn Professor Dr. E.D. Albert von der Kinderpoliklinik der Universität München und seinen Mitarbei-

tern im Tissue Typing Labor danke ich für wichtige
Informationen.

Herrn Dr. L. Gürtler vom Institut für Anthropologie
und Humangenetik der Universität München danke ich
für seine wertvollen Anregungen.

L e b e n s l a u f

Name: W e b e r

Vorname: K a r i n Elisabeth

Geboren am: 12. September 1952

Geboren in: Augsburg

Konfession: römisch-katholisch

Vater: W e b e r Ernst
Bankdirektor

Mutter: W e b e r Anna
geb. Hammerl

Schulen: Volksschule in Augsburg
1959 bis 1963
Neusprachliches Gymnasium der
Englischen Fräulein in Augsburg
1963 bis zum Abitur 1972

Universität: Tierärztliche Fakultät der
Ludwig-Maximilian-Universität
München
Wintersemester 1972/73 bis
Wintersemester 1977/78
Staatsexamen: 15. November 1977
Bestallung: 9. Dezember 1977
Promotionsstudium seit Juni 1978

Berufstätigkeit: Seit 1. März 1980 Assistentin bei
einem praktischen Tierarzt

